Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F.R.C.Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

STUDIE ZUR ENTWICKLUNG EINER GEEIGNETEN METHODE ZUR MESSUNG VON INHIBIN IN RINDER-FOLLIKELFLÜSSIGKEIT UND RATTEN-TESTIKULARGEWEBE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
CHRISTIAN MICHAELSEN
aus Eichstätt
1983

UNIV.
LEIDEN
PHIL.

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F.R.C.Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

STUDIE ZUR ENTWICKLUNG EINER GEEIGNETEN METHODE ZUR MESSUNG VON INHIBIN IN RINDER-FOLLIKELFLÜSSIGKEIT UND RATTEN-TESTIKULARGEWEBE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
CHRISTIAN MICHAELSEN
aus Eichstätt
1983

Dekan: Professor Dr. D. Flester

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Gupta

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ranke

Meinen Eltern gewidmet

Herrn Professor Dr. D. Gupta danke ich für die Überlassung des Themas und für wertvolle Anregungen während meiner Tätigkeit in seinem Labor.
Außerdem danke ich Herrn Diplom-Biochemiker B. Blank für seine freundliche Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Überblick	1
1.2.	Historischer Rückblick	3
1.3.	Inhibin - aus heutiger Sicht	6
1.4.	Fragestellung	12
2.	INHIBIN-MESSMETHODEN (EXISTIERENDE METHODEN)	13
2.1.	In-Vivo-Methoden	13
2.2.	In-Vitro-Methoden	16
3.	INHIBIN-MESSMETHODEN (EIGENE UNTERSUCHUNGEN)	20
3.1.	Materialien	20
3.2.	Methoden	23
3.2.1.	Inhibinquellen	23
3.2.2.	Assay mit Hypophysenzellen	26
3.2.3.	Assay mit Hypophysenhälften	40
3.2.4.	Ratten-FSH-Radioimmunoassay	43
3.3.	Ergebnisse	46
3.4.	Diskussion	68
4.	ZUSAMMENFASSUNG	75
5.	ANHANG	77
6.	LITERATURVERZEICHNIS	78

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0013

1. EINLEITUNG

1.1. Überblick

Trotz Gewinnung tieferer Einblicke in endokrinologische Vorgänge in den letzten Jahren sind viele Fragen auf diesem Gebiet offen geblieben. So sind unter anderem die Mechanismen der Steuerung von Hypophysenhormonen noch nicht entgültig geklärt. Insbesondere ist es nur teilweise gelungen, Klarheit über die Wirkungsweise der "Hypophysen-Gonaden-Achse" zu gewinnen, und die in diesem Zusammenhang interessierenden Mechanismen in der Regulation der Gonadotropine aufzuklären.

Die negative Regelkreis-Wirkung testikulärer Steroidhormone auf die zirkulierende Menge an Luteinisierendem Hormon (LH) ist wohl bekannt (LEE et al.,1972 ; GUPTA,1974 ; STEWARD-BENTLEY et al.,1974 ; GUPTA et al.,1975).
Weniger klar ist jedoch, in welcher Weise gonadale Faktoren in die Regulation des Follikel-Stimulierenden Hormons (FSH) eingreifen. Alle bisher untersuchten testikulären Steroidhormone hemmen die LH-Sekretion effektiver als die des FSH, und keines zeigte bisher eine selektive hemmende Wirkung auf das FSH (FRANCHIMONT,1972 ; SHERINS and LORIAUX,1973 ; SWERDLOFF and WALSH,1973).
Schon früh gab es deshalb Vertreter der Ansicht, daß in der Regelung des FSH andere Mechanismen als in der des LH wirksam seien. So wurde neben den testikulären Steroidhormonen die Existenz eines weiteren Hodenhormons postuliert, welches an der Regulation der Gonadotropine, speziell des FSH, beteiligt sei (s.u.).

Inzwischen kann die Existenz eines solchen Hormons, Inhibin genannt (Mc CULLAGH,1932), als gesichert gelten, und es wurde auch beim weiblichen Geschlecht nachgewiesen (s.1.3.).

Das gegenwärtige Interesse an Inhibin konzentriert sich einerseits auf die Aufklärung von Angriffsort und Wirkungs-

UNIV. LEIDEN

weise, also der Physiologie des Inhibins, andere Untersuchungen beschäftigen sich vornehmlich mit der chemischen Charakterisierung und Isolierung von Inhibin.
Viel Energie wird auch in die Entwicklung geeigneter Inhibin-Meßmethoden eingesetzt, da dies gewissermaßen die Voraussetzung für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet darstellt.

1.2. Historischer Rückblick

Erste Hinweise auf die Existenz eines im Regelkreis-Mechanismus auf die Gonadotropine eine Rolle spielenden tubulären Hodenhormons gab es schon in den Zwanzigerjahren. So fanden MOTTRAM und CRAMER (1923) histologische Veränderungen mit Zeichen von Überfunktion an Hypophysenzellen von Ratten, deren Hoden sie zuvor Röntgenbestrahlungen ausgesetzt hatten. Diese Hoden wiesen verschiedene Schäden am Tubulusgewebe auf, wobei die Leydigschen Zwischenzellen intakt waren. Sie schlossen daraus, daß das Fehlen eines hypothetischen hemmenden Faktors, dessen Bildungsort das Tubulusgewebe sei, die hypertrophischen Veränderungen an den Hypophysenzellen verursachen würden.
Einige Jahre später zeigten MARTINS und ROCHA (1931), daß wässrige Hodenextrakte diese Veränderungen an den Hypophysenzellen kastrierter Ratten verhindern konnten. Dies veranlaßte Mc Cullagh, der im folgenden diese Ergebnisse bestätigte (Mc CULLAGH,1932), ein zweites Hodenhormon zu postulieren, das er "Inhibin" nannte.

Unterstützende Ergebnisse für diese "Inhibinhypothese lieferten Arbeiten in den Vierzigerjahren, als es möglich geworden war, Gonadotropine im Urin mit Hilfe eines Bioassays (KLINEFELDER et al.,1942) zu bestimmen. Man fand erhöhte Gonadotropinwerte bei Männern, deren Hodengewebe aus verschiedenen Ursachen (Infektion, Bestrahlung, idiopathisch, etc.) geschädigt war.
DEL CASTILLO et al. (1947) fanden erhöhte Urin-FSH-Spiegel nur bei den Männern, bei denen die Hodenzellschädigung auch die Sertoli-Zellen betraf. Umgekehrt waren die Urin-FSH-Spiegel in der Norm, wenn die Schädigung unter Erhaltung der Sertoli-Zellen nur die Keimzellen betraf. Sie schlossen aus diesen Ergebnissen, daß die Sertoli-Zelle eine Substanz produziere, die in der Lage sei, hemmend auf die FSH-Ausschüttung der Hypophyse zu wirken. Dieser Interpretation schloß sich damals jedoch nur ein geringer Teil der Autoren

an. Mehrheitlich stellte man sich im Rahmen einer "Nonutilisation Hypothesis" vor, daß das geschädigte Tubulusepithel die Fähigkeit verloren habe, Gonadotropine zu inaktivieren, und auf diese Weise zu deren erhöhten Urin-Spiegel führe (HELLER and NELSON,1948).

Das Interesse an der Inhibinhypothese erwachte erst wieder Anfang der Siebzigerjahre, als man mit Hilfe radioimmunologischer Hormonbestimmungsmethoden tiefere Einblicke in die Funktion der Hypophysen-Gonaden-Achse gewann. Es war nun möglich geworden, Gonadotropin-Spiegel im Serum zu bestimmen. Wie vorherige Ergebnisse vermuten ließen, fand man ein unterschiedliches Verhalten der Serumspiegel von FSH und LH.
So konnte beim Menschen gezeigt werden, daß Testosterongaben den LH-Spiegel senken, ohne den FSH-Spiegel wesentlich zu beeinflussen (LEE et al.,1972). Umgekehrt ergab sich im Tierexperiment, daß Infusionen von androgenfreien wässrigen Hodenextrakten isoliert den FSH-Spiegel senken konnten (KEOGH et al.,1976 ; LEE et al.,1976). Eine nicht-steroidale Substanz mußte folglich als Bestandteil dieses Hodenextraktes diese Suppression bewirkt haben.
Entsprechende Ergebnisse erhielten GUPTA et al. (1975) aus tierexperimentellen Untersuchungen. Aus dem unterschiedlichen Verhalten der Gonadotropine und Steroidhormone bei kastrierten bzw. cryptorchen Ratten schlossen sie auf die Existenz eines weiteren Faktors, der neben den Steroidhormonen eine Rolle im negativen Regelkreis der FSH-Regulation spielen soll.
Im gleichen Sinn sind klinische Ergebnisse zu werten, die man bei Untersuchungen von Männern erhielt, deren Keimepithel unter Erhaltung der androgenproduzierenden Leydigschen Zwischenzellen geschädigt war. Es zeigte sich dabei ein wesentlich höherer Anstieg von FSH als von LH, was ganz im Sinne Mc Cullaghs gedeutet wurde, nämlich als Wegfall eines von den Tubuli seminiferi produzierten Hemmstoffs, der vorzugsweise auf FSH wirke (ROSEN and WEINTRAUB,1971;

FRANCHIMONT et al.,1972 ; LEONARD et al.,1972 ; DE KRETSER et al.,1974 ; VAN THEIL et al.,1972).
Obwohl alle frühen Erkenntnisse über Inhibin an Männern und männlichen Tieren gewonnen wurden, zeigte sich, daß das Vorkommen von Substanzen mit Inhibin-artiger Wirkung nicht auf das männliche Geschlecht beschränkt ist. So berichteten DE JONG und SHARPE (1976) und WELSCHEN et al. (1977) über das Vorkommen von Substanzen mit Inhibin-ähnlichem Charakter in Follikelflüssigkeit von Rinder- und Schweineovarien. Diese Ergebnisse lassen eine Beteiligung Inhibin-ähnlicher Faktoren an der Regulation der zyklischen endokrinen Vorgänge beim weiblichen Geschlecht vermuten (s.1.3.).

In den letzten Jahren kam Inhibin in Zusammenhang mit der Suche nach vom Mann anzuwendenden Kontrazeptionsmöglichkeiten vermehrt in Diskussion. Da ein ausreichender FSH-Serumspiegel für die Spermatozytenreifung notwendig zu sein scheint (LOSTROH,1976), ergäbe sich durch selektive Erniedrigung des FSH-Spiegels mit Hilfe von Inhibin ein Ansatz, die Bildung befruchtungsfähiger Spermien zu verhindern, ohne den Testosteron-Spiegel nennenswert zu beeinflussen (FRANCHIMONT et al.,1978).

1.3. Inhibin - aus heutiger Sicht

Es scheint bis heute schwierig zu sein, die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse zu einem geschlossenen Konzept zusammenzufassen. Dennoch bestehen übereinstimmende Ansichten über einige Aspekte des Inhibins.

Es kann heute als gesichert gelten, daß Inhibin in seiner chemischen Struktur ein Protein bzw. Polypeptid ist. Als solches ist es wasserlöslich und läßt sich durch proteolytische Enzyme wie Trypsin (LORENZEN et al.,1978 ; DEMOULIN et al.,1980 ; THAKUR et al.,1981), Pepsin (BAKER et al., 1976) und Papain (CAHOREAU et al.,1979) inaktivieren. Demgegenüber sind die Angaben über die Hitzestabilität von Inhibin bei Wärmeanwendung von über 60°C uneinheitlich. Meist wurde eine Zerstörung der biologischen Aktivität gefunden (STEINBERGER and STEINBERGER,1976 ; BLANC,1980 ; FRANCHIMONT et al.,1980). Inhibinpräparationen mit niedrigem Molekulargewicht scheinen nach HAFES (1980) hitzestabiler zu sein. So fanden auch VIJAYALAKSHMI et al. (1980a,b) in Gewebshomogenaten aus Schafshoden und Ovarien eine Inhibin-ähnliche Substanz mit einem Molekulargewicht von 1500 Dalton, die Hitzestabilität zeigte.

Offene Fragen bestehen derzeit auch noch bezüglich des Molekulargewichtes von Inhibin. Hierüber findet man Angaben, die sich in sehr weiten Grenzen bewegen: zwischen Inhibin obengenannter Quelle mit einem Molekulargewicht von 1500 Dalton (VIJAYALAKSHMI et al.,1980a,b) und Inhibin aus Schafs-Rete-Testis-Flüssigkeit mit einem Molekulargewicht von mehr als 160000 Dalton (CAHOREAU et al.,1979). Alle weiteren Angaben über das Molekulargewicht von Substanzen mit Inhibinwirkung bewegen sich innerhalb dieser Grenzen, wobei sich weder speziesspezifische noch organspezifische Schwerpunkte erkennen lassen (als Übersicht siehe BLANC, 1980).
Darüber hinaus erwies sich die Inhibinaktivität innerhalb einer biologischen Quelle als teilweise heterogen. So

erhielten DAVIS et al. (1976,1978) nach chromatographischer Auftrennung von Schafs-Rete-Testis-Flüssigkeit drei verschiedene Inhibin-artig wirkende Proteine mit Molekulargewichten von unter 5000, 20000 und 90000 Dalton.
Zu ähnlichen Ergebnissen kamen FRANCHIMONT et al. (1980). Sie äußerten die Vermutung, daß es sich bei dem Protein mit höherem Molekulargewicht um ein aktives Polymer des niedermolekularen, bzw. die Kombination eines aktiven Inhibin-Moleküls mit einer Trägersubstanz handle, oder um ein "precursor molecular" mit einer biologisch aktiven prosthetischen Gruppe, die unter bestimmten Umständen abgespalten werden könne.

Lange Zeit gab es nur Vermutungen über den Bildungsort des Inhibins, wobei, das männliche Geschlecht betreffend, einerseits mehr die Spermatide (FRANCHIMONT et al.,1972), andererseits mehr die Sertolizelle (VAN THIEL et al., 1972), wie auch die Spermatogonie (MECKLENBURG et al., 1975) verdächtigt wurde.
Diese Frage wurde von STEINBERGER und STEINBERGER (1976) geklärt, indem sie zeigten, daß isolierte Ratten-Sertolizellen in Kultur fähig sind, Inhibin in das Kulturmedium auszuschütten. Diese in vitro gewonnenen Erkenntnisse wurden durch In-Vivo-Experimente mit Ratten bestätigt, die eine negative Korrelation zwischen Plasma-FSH-Spiegel und Anzahl der Sertolizellen nach Röntgenbestrahlung der Hoden in allen Altersgruppen zeigten (DE JONG and SHARPE,1977).

Da die ovarielle Granulosazelle als analog zur testikulären Sertolizelle anzusehen ist, lag es nahe, diese als Inhibin-Bildungsort beim weiblichen Geschlecht zu vermuten. Die Bestätigung hierfür lieferten ERICKSON und HSUEH (1978), die bewiesen, daß isolierte Ratten-Granulosazellen in Kultur in der Lage sind, Inhibin-artige Substanzen zu produzieren. Entsprechend beobachteten CHANNING et al. (1981) bei menschlichen Ovarien geringere Inhibin-Konzentrationen in der Flüssigkeit zystisch veränderter Follikel, welche erfah-

rungsgemäß weniger Granulosazellen besitzen.

Die wohl am besten untersuchte Wirkung des Inhibins ist die Senkung des FSH-Serumspiegels. Diese Wirkung wurde übereinstimmend in In-Vivo-Untersuchungen bei diversen Tierspezies wie Schaf (KEOGH et al.,1976 ; LEE et al.,1976), Maus (VIJAYALAKSHMI et al.,1980a) und Ratte (NANDINI et al., 1976 ; DAVIS et al.,1978 ; BANDIVDEKAR et al.,1981 ; CHARI et al.,1981) nachgewiesen. Alle diese Untersuchungen zeigten eine durch Inhibin verursachte Hemmung des reflektorischen FSH-Anstieges nach Kastration bzw. Ovarektomie. Andere Arbeiten mit Ratten beschrieben eine FSH-Erniedrigung im intakten Tier nach Inhibin-Gabe (DE PAOLO et al.,1979b; HERMANS et al.,1980). Entsprechend konnte man nachweisen, daß die Applikation von Antikörpern gegen Inhibin bei Ratten zum FSH-Anstieg führt (SHETH et al.,1980).

In-Vitro-Untersuchungen verdeutlichten, daß die beschriebene Wirkung des Inhibins zumindest teilweise durch direkten Angriff auf die Hypophysenzelle verursacht wird. Isolierte Ratten-Hypophysenzellen in Kultur schütten in das Kulturmedium dosisabhängig weniger FSH aus, wenn dem Medium Inhibin zugesetzt wurde. Dies betrifft sowohl die Basal-FSH-Ausschüttung (STEINBERGER and STEINBERGER,1976 ; DE PAOLO et al.,1979a ; SHANDER et al.,1980 ; HOCHBERG et al.,1981), als auch die LHRH-induzierte FSH-Ausschüttung (EDDIE et al.,1978 ; DE JONG et al.,1979 ; SCOTT and BURGER,1981a).
Da jedoch bei solchen Zellkulturen unter Inhibin-Einfluß auch der Zellgehalt an FSH abnimmt (FRANCHIMONT et al., 1978 ; SCOTT et al.,1980), läßt sich eine Beeinflussung nicht nur der FSH-Ausschüttung, sondern auch der Synthese vermuten. Dies bestätigten Versuche, die eine Erniedrigung der Gesammt-FSH-Menge als Summe aus Zellgehalt und Ausschüttung unter Inhibin-Einfluß demonstrieren (ERICKSON und HSUEH,1978 ; SCOTT and BURGER,1981). Einen direkten Beweis für die Hemmung der FSH-Synthese durch Inhibin

lieferten CHOWDHURY et al. (1978). In Ratten-Hypophysenzellkulturen wiesen sie eine Erniedrigung der Inkorporation von ^{3}H-Leycin in FSH unter Inhibin-Einfluß nach.
LECOMTE-YERNA et al. (1981) berichteten über eine Erniedrigung des intrazellulären c-AMP-Spiegels in Hypophysenzellen, die mit Inhibin zusammen kultiviert worden waren, und schlossen daraus, daß Inhibin über eine c-AMP-Erniedrigung zur FSH-Synthesehemmung führe.

Weniger eindeutig, wie auf das FSH, scheint die Wirkung des Inhibins auf das LH zu sein. Bei In-Vivo-Untersuchungen wurde in einigen Arbeiten kein Einfluß von Inhibin auf den LH-Serumspiegel festgestellt (WELSCHEN et al.,1977 ; SHETH et al.,1979a ; CHARI et al.,1981).
Andererseits berichteten DE PAOLO et al. (1979b) über eine Erniedrigung des LH-Serumspiegels bei Ratten nach Injektion von Inhibin. BLANC et al. (1978) fanden in ähnlichen Untersuchungen bei Schafen, daß zuerst der LH-Spiegel abnahm, und erst im folgenden der FSH-Spiegel, als der LH-Spiegel wieder zur Norm zurückgekehrt war.
Im Gegensatz dazu stellten DE JONG et al. (1978) sogar eine Zunahme des LH-Spiegels bei Ratten fest, die über 17 Tage mit Inhibin behandelt worden waren.
Ähnlich widersprüchlich sind die Angaben über Ergebnisse aus In-Vitro-Untersuchungen. Einerseits wurde ein Fehlen jeglichen Einflusses von Inhibin auf die LH-Basalsekretion (STEINBERGER and STEINBERGER,1976 ; SHANDER et al.,1980) und die LHRH-induzierte LH-Ausschüttung (HOCHBERG et al., 1981) beschrieben, andererseits wurden gegenteilige Erfahrungen gemacht mit Erniedrigung der LH-Ausschüttung (DAVIS et al.,1978 ; LABRIE et al.,1978 ; EDDIE et al.,1979 ; HENDERSON and FRANCHIMONT,1981 ; SCOTT and BURGER,1981a).
Teilweise waren nur sehr hohe Inhibin-Konzentrationen in der Lage, sowohl die FSH- als auch die LH-Ausschüttung zu erniedrigen, wobei geringere Inhibin-Konzentrationen eine selektive Wirkung auf das FSH zeigten (ERICKSON and HSUEH, 1978). Da bei oben genannten Untersuchungen teilweise nur

wenig gereinigte Inhibin-Präparationen Verwendung fanden, läßt sich nach SCOTT und BURGER (1981a) nicht entscheiden, ob Inhibin einen Einfluß auf die LH-Freisetzung besitzt, oder ob es sich um die Wirkung nicht-Inhibin-artiger Proteine handelt. Einen Hinweis für letztgenannte Hypothese lieferten SMITH et al. (1979a), die über das Vorkommen eines spezifisch LH-hemmenden Proteins in Rinderhodenextrakten berichteten.

Im Gegensatz zur Wirkung auf LH konnte man übereinstimmend keinen Einfluß von Inhibin auf andere Hypophysenhormone wie TSH, Prolaktin und STH nachweisen (BLANC et al.,1978 ; DESMOULIN et al.,1979 ; FRANCHIMONT et al.,1980 ; HENDERSON and FRANCHIMONT,1981).

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, die zu der Annahme führen, daß neben der Hypophyse auch andere Organe als möglicher Angriffsort des Inhibins in Frage kommen.
So ist auf Grund verschiedener Ergebnisse eine direkte Wirkung des Inhibins auf der Ebene des Hypothalamus wahrscheinlich. UKARO et al. (1974) injizierten eine proteinartige Substanz, die sie aus Rinder-Spermatozoen gewonnen hatten, in die Seitenventrikel kastrierter männlicher Ratten und erreichten damit eine Erniedrigung des Serum-LHRH-Spiegels. WOODBURY et al. (1981) erhielten einen erniedrigten hypothalamischen LHRH-Zellgehalt bei Ratten, denen sie zuvor Inhibin verabreicht hatten. Zu entsprechenden Ergebnissen kamen DESMOULIN et al. (1980) in vitro mit Hypothalamusgewebekulturen.
Befunde von VANDEN et al. (1980) lassen auch an die Epiphyse als möglichen Angriffsort des Inhibins denken. Sie stellten bei Ratten eine spezifische Bindung radioaktiv markierten Inhibins sowohl an die Hypophyse als auch an die Epiphyse fest.
Vielfältige Hinweise gibt es für eine direkte Wirkung des Inhibins im Bereich seines Bildungsorgans, also des Hodens bzw. des Ovars. VANDEN et al. (1981) fanden bei männlichen

Ratten eine verminderte testikuläre Bindung radioaktiv markierten FSHs bei Tieren, die zuvor Inhibin erhalten hatten. Entsprechende Ergebnisse hatten zuvor VIJAYALAKSHMI et al. (1980b) erhalten, die eine verminderte Bindung radioaktiv markierten FSHs an isolierte testikuläre Rezeptoren unter Inhibin-Einfluß beschrieben. Andererseits konnten CROZE et al. (1980) in vitro unter Inhibin eine direkte Hemmung der testikulären DNA-Synthese und damit der mitotischen Aktivität beobachten.
Auch beim weiblichen Geschlecht wurde durch Untersuchungen bei Ratten eine direkte Wirkung von Inhibin auf die Gonaden nachgewiesen, die sich in zahlreichen strukturellen Veränderungen am Ovar zeigte (DE PAOLO et al.,1979b ; FRANCHIMONT et al.,1980 ; CHARI et al.,1981).

Der Nachweis von Substanzen mit Inhibin-Aktivität in diversen biologischen Quellen wie Samenflüssigkeit, Rete-Testis-Flüssigkeit, Spermatozoen etc. (als Übersicht siehe HAFEZ, 1980), bzw. Follikelflüssigkeit (DE JONG and SHARPE,1976) und Plazentagewebe (BANDIVDEKAR et al.,1981) lassen auf eine Beteiligung von Inhibin an diversen physiologischen Vorgängen schließen. So weisen die Schwankungen der Inhibin-Aktivität innerhalb des zyklisch-endokrinen Geschehens beim weiblichen Geschlecht auf eine mögliche Beteiligung bei diesen Vorgängen hin (DE PAOLO et al.,1979a,b ; SHANDER et al.,1980 ; CHANNING et al.,1981 ; LEE et al.,1981 ; KONINCKX et al.,1981). Weiterhin lassen Ergebnisse aus Tierversuchen, die eine unterschiedliche Kinetik des Inhibins in verschiedenen Altersstufen zeigen, an eine mögliche Beteiligung des Inhibins an der Auslösung der Geschlechtsreife denken (HERMANS et al.,1980 ; SHETH et al.,1980 ; VANAGE et al.,1980 ; JOHNSON et al.,1981).

All diese Befunde skizzieren lediglich ein vages Bild von Inhibin, ein geschlossenes Konzept scheint jedoch noch nicht in Sicht. Vielfältige Bemühungen sind deshalb notwendig, das "Problem Inhibin" weiter zu erhellen.

1.4. Fragestellung

Bisher ist es nicht gelungen, ein eindeutiges Bild von der Wirkungsweise und physiologischen Bedeutung des Inhibins zu erhalten (s.1.3.). Vermehrte Anstrengungen sind deshalb notwendig, um Unklarheiten auf diesem Gebiet zu beseitigen. Voraussetzung hierfür ist die Existenz praktikabler und spezifischer Inhibin-Meßmethoden.

Die vorliegende Arbeit soll bereits beschriebene Inhibin-Meßmethoden darlegen und durch eigene Untersuchungen einige Methoden auf ihre Qualität überprüfen.
Durch Herausgreifen geeigneter Methoden und durch Suche nach Verbesserunsmöglichkeiten bzw. kritischer Erprobung eingeführter Veränderungen soll eine für weitere Studien auf dem "Inhibingebiet" geeignete Inhibin-Meßmethode mit ausreichender Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit bereitgestellt werden.

2. INHIBIN-MESSMETHODEN (EXISTIERENDE METHODEN)

2.1. In-Vivo-Methoden

Aus der Tatsache, daß Inhibin in den Gonaden gebildet wird, ergibt sich, daß kastrierte Tiere als geeignete Biosysteme zur Inhibin-Messung verwendet werden können. Dabei wird ihnen nach der Kastration die zu messende Inhibin-Menge verabreicht, und man betrachtet das Ausmaß der Hemmung des normalerweise einer Kastration folgenden FSH-Anstieges als Parameter für die Inhibin-Aktivität.
Es gibt viele Varianten dieses Assay-Systems. Einige sollen hier erwäht werden.

So sind die Angaben über das Zeitintervall zwischen Kastration und Inhibin-Gabe recht unterschiedlich. Teilweise verwendet man langzeit-kastrierte Tiere, meist Ratten, wobei der entsprechende Zeitabschnitt ca. 2 Wochen beträgt (HOPKINSON et al.,1977 ; THAKUR et al.,1978 ; BANDIVDEKAR et al.,1981). Hierbei wird der bereits erhöhte FSH-Spiegel sekundär durch Inhibin gesenkt, und das Ausmaß dieser Senkung gilt als Gradmesser der Inhibin-Aktivität. Es läßt sich eine Inhibindosis-abhängige Suppression des FSH-Serum-Spiegels erkennen. Obwohl reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden können, ist die langzeit-kastrierte Ratte wegen einer geringen Empfindlichkeit gegenüber Inhibin kein geeignetes Assay-Modell. Die Antwort des hypothalamo-hypophysären Systems scheint sich nämlich mit der Kastrationsdauer zu verringern (MOODBIDRI et al.,1980).

Dieses Problem kann durch die Verwendung akut-kastrierter Ratten umgangen werden. Hierbei kommt es durch unmittelbar nach der Kastration vorgenommene Inhibin-Gabe erst gar nicht zum FSH-Anstieg. Der Unterschied des FSH-Serum-Spiegels dieser Tiere zur Kontrollgruppe (kastriert, ohne Inhibin) wird nach einigen Stunden als Maß für die Inhibin-Aktivität angesehen. DAVIS et al. (1976) und NANDINI et al. (1976)

beschrieben Assay-Methoden, in denen männliche, 35 Tage alte Ratten Verwendung finden, also in einem Alter, in dem der FSH-Serum-Spiegel innerhalb der pubertären Entwicklung gerade ein Maximum erreicht hat (GUPTA et al,.1975). Diese FSH-Spitze wird darüber hinaus durch Kastration am 34. Tag erhöht. Inhibin wird entweder verabreicht als einzelne Injektion am Morgen nach der Kastration oder als dreimalige Injektion, eine unmittelbar nach der Kastration, die zweite 6 Stunden später und die dritte am nächsten Morgen. 2 1/2 Stunden nach der letzten Injektion entnimmt man die Blutprobe zur FSH-Bestimmung.
In Abwandlung des Obengenannten wurde von anderen Untersuchern die Verwendung erwachsener akut-kastrierter Ratten (DE JONG and SHARPE,1976) und Mäuse (LEE et al.,1977) empfohlen.
Alle diese Assay-Systeme, die sich akut-kastrierter Tiere bedienen, zeigen gegenüber den Methoden mit langzeitkastrierten Tieren eine ausgeprägtere FSH-Hemmung durch Inhibin und damit eine größere Empfindlichkeit (CHARI et al.,1978).

Nach verwandtem Prinzip, wie unter Verwendung langzeitkastrierter Tiere arbeitet ein Inhibin-Assay, das von KEOGH et al. (1976) und BAKER et al. (1976) beschrieben wurde. Hierbei dienen vorpubertär-kastrierte erwachsene Schafe als Versuchstiere. Sie erhalten für eine Dauer von 24 Stunden Inhibin-Infusionen. Dabei gilt der sich nach 1-2 Tagen einstellende Abfall des FSH-Serumspiegels gegenüber dem vor der Infusion als Parameter für die Inhibin-Aktivität. Allerdings eignet sich dieses Assay-System auf Grund seiner Ungenauigkeit weniger zum quantitativen als vielmehr zum qualitativen Inhibin-Nachweis (MOODBIDRI et al.,1980).

Das folgende Inhibin-Assay arbeitet nach einem anderen Prinzip wie die obenerwähnte Methoden. Die parenterale Verabreichung von HCG an vorpubertäre Ratten und Mäuse bewirkt eine Gewichtszunahme von Ovar und Uterus als Folge des Synergismus von endogenem FSH und zugeführtem HCG. Inhibin

hemmt die endogene FSH-Ausschüttung und unterdrückt so die normalerweise auf HCG-Gabe folgende Gewichtszunahme dieser Organe. Das Ausmaß dieser Hemmung der Gewichtszunahme von Ovar (CHARI et al.,1976) und Uterus (RAMASHARMA et al., 1979) wird als Gradmesser der Inhibin-Aktivität angesehen. DAVIS et al. (1976) halten allerdings dieses Assay-System auf Grung mangelhafter Reproduzierbarkeit und Spezifität für nicht geeignet als Routinemethode. Zu ähnlicher Bewertung kommen HUDSON et al. (1979).

2.2. In-Vitro-Methoden

Mit Ausnahme des Radioimmunoassays (s.u.) arbeiten alle In-Vitro-Meßmethoden für Inhibin nach ähnlichem Prinzip. Die Änderung des FSH-Stoffwechsels isolierter Ratten-Hypophysenzellen bzw. Hypophysengewebes in Kultur unter Inhibineinfluß ist der entscheidende Aspekt. Somit ist die Änderung der FSH-Konzentration, jedoch im Gegensatz zu den In-Vivo-Methoden nicht der Serumkonzentration, sondern der Konzentration im Kulturmedium, der eigentliche Inhibin-Indikator. Auch bei diesen Methoden gibt es diverse Variationen.

Eine ganze Reihe von Untersuchern verwenden Kulturen mit enzymatisch getrennten Ratten-Hypophysenzellen.
EDDIE et al. (1978,1979) empfehlen eine initiale 2-tägige Inkubationsphase ausschließlich mit Kulturmedium, in der sich die Zellen am Gefäßboden festhaften können. Nach Mediumwechsel, und in einem Teil der Kulturen Beigabe von Inhibin-Testsubstanz folgt eine 3-tägige Inkubationsphase. Nach dieser Zeit wird das Medium erneut gewechselt. Die selben Kulturen wie zuvor erhalten Inhibin-Testsubstanz, und allen Kulturen wird LHRH (10nM) zur Stimulation der FSH-Ausschüttung beigegeben. Diese letzte Inkubationsphase dauert 6 Stunden und ist der eigentliche Meßschritt. Denn der Unterschied der FSH-Konzentration im Kulturmedium dieses letzten Inkubationsschrittes zwischen den Kulturen, die Inhibin erhalten haben, und denen ohne Inhibin, wird als Maß für die Inhibin-Aktivität angesehen. Auf diese Weise erhielten EDDIE et al. (1978,1979) eine Inhibindosis-abhängige Erniedrigung der FSH-Konzentration im Medium dieser Zellkulturen.
Mit kleinen Abweichungen wurde diese Methode von anderen Untersuchern verwendet. Teilweise wurde eine Ausdehnung der initialen Inkubationsphase auf 3 Tage empfohlen (DE JONG et al.,1978 ; HENDERSON and FRANCHIMONT,1981), oder zur Stimulation der FSH-Ausschüttung unterschiedliche Mengen an LHRH der Kultur beigegeben, wie 0,3 nM (LABRIE et al.,

1978), 50 nM (DE JONG et al.,1979) oder 100 nM (STEINBERGER,1979).
Diese und andere Variationen stellen jedoch nur Spielarten der oben beschriebenen Methode dar und sind ihrem Prinzip nach gleich.
Im Gegensatz dazu verzichten andere Autoren auf die Verwendung des dritten Inkubationsschrittes, wodurch die zweite Phase zum eigentlichen Meßschritt wird. Unter Verzicht auf die durch LHRH bewirkte Stimulation der FSH-Ausschüttung wird die Hemmung der FSH-Basalausschüttung in der zweiten Inkubationsphase als Parameter für die Inhibin-Aktivität angesehen. Nach einer 3-tägigen initialen Inkubationsphase ausschließlich mit Kulturmedium folgt ein Mediumwechsel, wobei ein Teil der Kulturen zusätzlich Inhibin-Testlösung erhält. Die nun folgende Meßphase dauert meist 3 Tage (ERICKSON and HSUEH,1978 ; DEMOULIN et al.,1979). Es werden jedoch auch kürzere Zeitabschnitte angegeben, wie 24 Stunden (DE PAOLO et al.,1979a ; CHANNING et al.,1981) und 18 Stunden (SHANDER et al.,1980).

Da Inhibin nicht nur die FSH-Ausschüttung, sondern auch die FSH-Synthese isolierter Ratten-Hypophysenzellen hemmt (s.1.3.), lag es nahe, ein Inhibin-Assay zu entwickeln, das sich der Bestimmung des FSH-Zellgehaltes bedient. Nach diesem Prinzip arbeitet eine von SCOTT et al. (1980) entwickelte Inhibin-Meßmethode. Nach einer Vorinkubation von 12-18 Stunden erfolgt die Zugabe von Inhibin-Testsubstanz. Nach weiteren 3 Tagen wird das Medium durch Triton-X enthaltenden Phosphatpuffer ersetzt. Dieses führt zu einer Lyse der Hypophysenzellen, wodurch das intrazelluläre FSH freigesetzt wird und im Phosphatpuffer bestimmt werden kann. Man findet eine Inhibindosis-abhängige Abnahme des FSH-Gehaltes in den isolierten Ratten-Hypophysenzellen (SCOTT et al., 1980 ; SCOTT and BURGER,1981b). Nach ihren Beschreibern soll dieses Bioassay gegenüber den vorher beschriebenen In-Vitro-Methoden den Vorteil haben, daß es eine große Präzision und Reproduzierbarkeit hat, und daß sich gleichzeitig

mehr Bestimmungen durchführen lassen, da weniger Zellen pro Kultur notwendig sind. Als einziger Nachteil wird eine geringere Empfindlichkeit hervorgehoben (SCOTT et al., 1980).

Alle Inhibin-Assaymethoden, die sich Hypophysenzellkulturen bedienen, haben den großen Nachteil, daß sie sehr aufwendig, zeitraubend und in ihrer Kapazität beschränkt sind.

Eine relativ einfach durchzuführende und weniger zeitaufwendige Methode wurde von DAVIS et al. (1978) beschrieben. Hypophysenhälften von erwachsenen männlichen Ratten werden nach einem Randomisierungsverfahren auf verschiedene Kulturgefäße verteilt. Nach kurzer Vorinkubation von ca. 30 Minuten wird das Medium ersetzt durch solches, das LHRH und Inhibin-Testsubstanz enthält. Einige Kulturen erhalten als Kontrolle kein Inhibin. Nach weiteren 3 Stunden wird das Kulturmedium entnommen und darin die FSH-Konzentration bestimmt. Gemaß ihren Beschreibern findet man bei dieser Methode eine Inhibin-Dosis-abhängige Erniedrigung der FSH-Konzentration im Kulturmedium, weshalb sie als geeignet für ein Inhibin-Assay angesehen wird.
Dagegen äußern sich andere Autoren kritisch zur Verwendung randomisierter Hypophysenhälften in Bioassays, da die einzelnen Gewebekulturen zu heterogen seien und deshalb in ihrem biologischen Reaktionsvermögen eine zu große Streuung aufwiesen (GUILLEMIN and VALE,1970). Aus diesem Grund seien Assaysysteme mit Kulturen aus gepaarten Hypophysenhälften vorzuziehen, die jedoch weniger als Methode zur quantitativen als vielmehr zur qualitativen Aussage geeignet seien. Durch ungleiches biologisches Verhalten der einzelnen Hypophysenhälftenpaare sei es nämlich äußerst problematisch, definierte Dosis-Wirkungsbeziehungen zu erhalten (GUILLEMIN and VALE,1970 ; O´CONNER et al.,1979).

Einen großen Fortschritt brachte die Entwicklung eines Radioimmunoassays für Inhibin durch SHETH et al. (1978).

Voraussetzung hierfür war die Gewinnung von Antikörpern gegen Inhibin. Dies gelang mit Hilfe von Kaninchen, die gegen Inhibin aus menschlicher Samenflüssigkeit immunisiert werden konnten. Diese Antikörper erwiesen sich als spezifisch, da sie keine Kreuzreaktion mit anderen Hormonen bzw. Proteinen zeigten. Mit Hilfe dieses RIAs ist es nun möglich, Inhibin in einer Größenordnung von einigen Nanogramm nachzuweisen, wodurch es gelungen ist, Inhibin-Spiegel im menschlichen Serum zu bestimmen, was durch die bisherigen Assay-Methoden nicht möglich gewesen war (SHETH et al., 1978 ; SHETH et al.,1979b).

3. INHIBIN-MESSMETHODEN (EIGENE UNTERSUCHUNGEN)

3.1. Materialien

3.1.1. Verwendete Substanzen

- Seren und Medien

Rinderalbumin: Behringwerke, Marburg No. ORHD 20/21
Pferde-Normalserum: Gibco No. 605
Foetales Kälberserum: Gibco No. 629
Kaninchen-Normalserum: Behringwerke, Marburg No. OTOR 04/05
DMEM-Pulver: Serva Feinbiochemica No. 47 303
Leibovitz- Medium: Gibco No. 141c

- Antibiotica

Penizillin/Streptomycin-Lösung: Gibco No. 541
Doxycyclin: Vibravenös^{R}, Pfizer GmbH
Chloramphenicol: Paraxin^{R}, Boeringer Mannheim
Polymyxin B: Pfizer GmbH
Amphotericin B: Fungizone^{R}, Gibco No. 529

- Enzyme

Trypsin: Sigma Chemicals, Typ I No. T-8003
DNAse: Sigma Chemicals, Typ DN-100 No. D-0751
Trypsin-Inhibitor: Sigma Chemicals, Typ I-S No. T-9003
Neuraminidase: Sigma Chemicals, Typ VI No. N-3001

- Zubehör für Ratten-FSH-RIA

r-FSH zur Jodierung: NIAMDD-Rat-FSH-1-3
(NIAMDD: National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestiv Diseases; Bethesta, USA)
r-FSH-Standardreferrenzpräparation: NIAMDD-Rat-FSH-RP-1
Anti-r-FSH-Antiserum: NIAMDD-Anti-Rat-FSH-S-6 vom Kaninchen
Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antiserum vom Esel:
Wellcome Reagents Ltd., England
$Na^{125}J$-Lösung: Amersham-Buchler, Frankfurt

- Zubehör für andere RIAs

Testosteron-RIA-Testset: DRG-Instruments GmbH
Östron-RIA-Testset: DRG-Instruments GmbH
Östradiol-RIA-Testset: DRG-Instruments GmbH

- Diverses

Sephadex-G-25: Pharma Fine Chemicals, Schweden
Aktivkohle: Norit-A^{R}, Serva-Feinbiochemica
LHRH: Relefact-LHRH^{R}, Hoechst AG
Trypanblau-Lösung: Serva-Feinbiochemica No. 47 285
Poly-L-Lysin: Sigma Chemicals, Typ VII-B No. P-2636
Nicht-Essentielle-Aminosäure-Lösung: Serva-Feinbiochemica
No. 47 215

3.1.2. Geräte und Gegenstände

Gewebekulturflaschen 50ml: Greiner Labortechnik No. 690 160
Multiwell-Kulturplatten: Costar 24-Well Tissue Culture
Clusters No. 3524
Zellulose-Filter: Millipore 0,22um
Ultrafiltrationsmembran: Amicon Diaflo UM 2
Ultrafiltrationszelle: Amicon 202
Zentrifugen: Hettich Rotix A/A
Christ UJ 2
Laminar-Flow-Sterilarbeitsplatz: Prettl Clean-Bench
Mikroskop: Olympus IM mit Photoaufsatz
Brutschrank: National a Weinicke Company
Zählröhrchen für Gammazähler: PS-Röhrchen konisch,
Greiner Labortechnik No.116101
Gammazähler: Auto-Gamma-Scintilations-Spectrometer,
Packard 5160

3.1.3. Versuchstiere

Mit Ausnahme der Gewinnung von Follikelflüssigkeit aus Rinderovarien wurden alle Versuche an Ratten durchgeführt. Es fanden männliche, 120 Tage alte Tiere des Stammes Wistar (bezogen von Tierzuchtanstalt Ivanovas, Kißlegg/Allg.) Verwendung. Sie wurden jeweils mindestens einen Tag vor der Tötung angeliefert, um eine gewisse Gewöhnung an die veränderten Verhältnisse zu gewährleisten. Die Haltung erfolgte unter einem jeweils 12-stündigen Hell/Dunkel-Rhythmus mit künstlichem Licht, und Trockenfutter sowie Trinkwasser stand zur freien Verfügung.

Die Ovarien zur Gewinnung von Follikelflüssigkeit stammte von Rindern. Es handelte sich um gesunde Tiere im fortpflanzungsfähigen Alter, die im Schlachthof Tübingen getötet wurden.

3.2. Methoden

3.2.1. Inhibinquellen

Sowohl "männliches Inhibin" aus Hodentubulikulturen als auch "weibliches Inhibin" aus Follikelflüssigkeit fanden bei den Versuchen Anwendung.

3.2.1.1. Hodentubulikultur

Im Medium von Ratten-Hodentubulikulturen läßt sich nach einigen Tagen Inhibin nachweisen (EDDIE et al.,1978). Für jeden Ansatz solcher Kulturen wurden jeweils zwei Ratten unter Chloroform-Narkose durch Dekapitation getötet. Um die Hoden möglichst steril zu gewinnen, wurden die Haare der Tiere im Brustbereich entfernt, und dort die Haut mit 80%-igem Äthanol desinfiziert. Nach zirkulärer Inzision zog man die Haut mit Hilfe zweier steriler Klemmen in Schwanzrichtung, bis die Hoden sichtbar wurden. Diese wurden freigelegt und die Tunica albuginea entfernt. Mit Hilfe zweier Präpariernadeln entfernte man vorsichtig das interstitielle Gewebe von den Tubuli seminiferi. Letztere wurden unter Verwendung einer sterilen Rasierklinge in ca. 1 mm lange Stückchen zerteilt. Das Tubulusgewebe eines jeden Rattenhodens (ca. 1,5g) wurde auf 5 Kulturgefäße (Gewebekulturflaschen 50ml) unter Zugabe von je 15ml Kulturmedium (Medium entsprach dem der Hypophysenzellkultur, s.3.2.2.5.) verteilt. Somit enthielt jedes Kulturgefäß ca. 0,3g Tubulusgewebe in 15ml Medium. Es folgte eine Inkubationsphase von 4 Tagen bei 34°C unter Begasung mit einem 5%-igem CO_2/Luft-Gemisch, um einen pH-Wert von ca. 7,3 zu gewährleisten. Am 5.Tag wurde jeweils das Medium gesammelt, mit 400g für 10 Minuten zentrifugiert und gefiltert (Zellulose-Filter, 0,22um). Um Steroidhormone zu entfernen, folgte eine Behandlung mit Dextran-beschichteter Aktivkohle (2,5mg Norit-A und 0,25mg Dextran-T-70 pro ml Kulturmedium). Die

Prozedur erfolgte bei ständigem Rühren für die Dauer von 12 Stunden bei einer Temperatur von 4°C. Eine alleinige Anwendung von Aktivkohle ohne Dextran ist nicht zu empfehlen, da dieses zwar ebenso zu einer Reduktion der Steroidhormone führt, jedoch zugleich mit einem bis zu 50%-igen Verlust der Inhibin-Aktivität verbunden ist, was durch eine Dextranbeschichtung verhindert werden kann (BAKER et al., 1978). Der Effekt der Kohlebehandlung ließ sich durch radioimmunologische Bestimmung des Testosterons nachweisen:

Testosteron im Tubulikulturmedium		
	vor Aktivkohle/Dextran-Behandlung	831 ng/dl
	nach "	5 ng/dl

Da der Gehalt solcher Hodengewebekulturen an Inhibin relativ gering ist - etwa 700mal geringer als in Follikelflüssigkeit von Rinderovarien (DE JONG et al.,1978) - wurde eine 10-fache Inhibin-Konzentrierung mit Hilfe einer Ultrafiltrationszelle mit Ultrafiltrationsmembran durchgeführt. Diese Membran besitzt eine Ausschlußgrenze bei einem Molekulargewicht von ca. 2000 Dalton, wodurch ein Großteil des Inhibins angereichert werden kann. Das Molekulargewicht von Inhibin wird nämlich von den meisten Autoren als wesentlich größer als 2000 Dalton angegeben (s.1.3.).
Bis zur weiteren Verwendung wurde das Konzentrat bei -20°C gelagert, nachdem sich gezeigt hatte, daß Inhibin durch negative Temperaturen nicht inaktiviert wird (BAKER et al., 1976 ; DEMOULIN et al.,1979 ; DE PAOLO et al.,1979b ; THAKUR et al.,1981). STEINBERGER (1979) hatte zwar bestätigt, daß die biologische Aktivität von Inhibin aus Sertolizellkulturen durch Lagerung bei verschiedenen Temperaturen unter dem Gefrierpunkt innerhalb einer Dauer von 2 Wochen erhalten bleibt, fand jedoch nach dieser Zeit eine schrittweise Abnahme der Aktivität bis auf 50% des Ausgangswertes in der 11.Woche. Aus diesem Grund wurden für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente als Inhibinquelle keine Präparationen aus Hodentubulikulturen und Follikel-

flüssigkeit (s.u.) verwendet, die länger als 8 Wochen gelagert worden waren.

3.2.1.2. Rinderfollikelflüssigkeit (FF)

DE JONG und SHARPE (1976) hatten als erste Inhibin in Follikelflüssigkeit von Rinderovarien nachgewiesen. Sie diente auch in einem Teil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche als Inhibinquelle.
Die Follikelflüssigkeit wurde durch Aspiration mit einer Spritze gewonnen, wobei darauf geachtet wurde, daß die gewählten Follikel einen Durchmesser zwischen 5mm und 20mm hatten. WELSCHEN et al. (1977) hatten nämlich gezeigt, daß nur die Flüssigkeit von Follikeln dieser Größe Inhibin in nennenswerter Menge enthält. Um Zelltrümmer etc. zu entfernen, wurde die Follikelflüssigkeit filtriert (Zellulosefilter, 0,22um). Es folgte die Entfernung von Steroidhormonen mit Hilfe Dextran-beschichteter Aktivkohle (pro ml: 10mg Norit-A und 1mg Dextran T-70). Dies erfolte bei 4°C unter ständigem Rühren für die Dauer von 12 Stunden. Die Aktivkohle ließ sich im folgenden durch Zentrifugation (2000g, 10min) und Filtration (Zellulosefilter, 0,22um) entfernen.
Der Erfolg der Aktivkohlebehandlung wurde mit Hilfe radioimmunologischer Steroidhormonbestimmung nachgewiesen:

Hormongehalt der Rinderfollikelflüssigkeit

	vor Aktivk.-Beh.	nach Aktivk.-Beh.
Testosteron	170 ng/dl	4,2 ng/dl
Östron	125 ng/dl	0,9 ng/dl
Östradiol	>700 ng/dl	1,9 ng/dl

Bis zur weiteren Verwendung wurde die behandelte Follikelflüssigkeit bei -20°C gelagert.

3.2.2. Assay mit Hypophysenzellen

3.2.2.1. Prinzip

Das Prinzip der verwendeten Methode wurde in seinen Grundzügen von EDDIE et al. (1978) entwickelt und bereits erwähnt (s.2.2.). LHRH ist nicht nur für die LH-Ausschüttung ein starker physiologischer Reiz, sondern auch für die FSH-Ausschüttung (SCHALLY et al.,1976), sodaß manche Autoren vermuten, es sei mit dem FSHRH (FSH-Releasing Hormone) identisch (WISE et al.,1979). Wie bereits erwähnt (s.1.3.), kann diese LHRH-induzierte FSH-Ausschüttung durch Inhibin unterdrückt werden.
Die verwendete Inhibin-Meßmethode macht sich diese Wirkung des Inhibins zu nütze. Die Hemmung der LHRH-induzierten FSH-Ausschüttung von enzymatisch getrennten Rattenhypophysenzellen in Kultur durch Inhibin wird bestimmt, wobei der Grad der Hemmung als Parameter für die Inhibin-Aktivität angesehen wird.

3.2.2.2. Hypophysenpräparation

Für jeden Versuchsansatz wurden 20 Ratten mit Chloroform betäubt und dekapitiert. Um Keimarmut zu erreichen, wurde der Kopf jeweils für ca. 1 Minute in 80%-iges Äthanol gelegt. Nach Freilegen der Hypophyse wurde diese mit Hilfe eines Skalpells vom umgebenden Gewebe befreit und auf einen Objektträger gebracht. Unter Verwendung einer Rasierklinge wurden die Hypophysen zerkleinert. Sämtliche zur Präparation benötigte Instrumente und Glaswaren waren zuvor bei 180°C 1 Stunde sterilisiert worden. Die Hypophysenstücke sämtlicher 20 Tiere wurden in einem konischen Zentrifugenglas aufgefangen, in dem sich 20ml Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer (KRB; KREBS,1950) mit 3 mg/ml Rinderalbumin (BSA) bei Zimmertemperatur (≙ Lösung 1, s.3.2.2.3.) befand.

3.2.2.3. Zelltrennungsprozedur

Zur Trennung der Hypophysenzellen wurde mit zwei verschiedenen Verfahren gearbeitet und diese miteinander verglichen:

A. Methode nach HOPKINS und FARQUHAR (1973)
B. Methode nach DENEF et al. (1976)

Alle zur Zelltrennungsprozedur benötigten Glasgefäße wurden zuvor silikonisiert, um ein Anheften der Zellen an die Glasoberfläche zu verhindern, und bei 180°C 1 Stunde sterilisiert.

A. Methode nach HOPKINS und FARQUHAR (1973)

Benötigte Reagentien:

Lösung 1 : Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer (KREBS,1950) mit Rinderalbumin (KRB/BSA)

NaCl	5,54g
KCl	0,35g
KH_2PO_4	0,16g
$NaHCO_3$	2,1 g
Na-Pyruvat	0,55g
Na-Fumarat	0,75g
Na-Glutamat	0,79g
Glukose	2,08g
$CaCl \cdot 2H_2O$	0,28g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,29g
BSA	3g

ad 1l mit Aqua dest., pH 7,5

Lösung 2 : KRB/BSA mit 1mg/ml Trypsin

Lösung 3 : KRB/BSA mit 2ug/ml DNAse

Lösung 4 : KRB/BSA mit 1mg/ml Trypsin-Inhibitor

Lösung 5 : Ca-und Mg-freies KRB/BSA mit 0,76mg/ml EDTA (≙ 2mM), pH 7,2

Lösung 6 : Ca-und Mg-freies KRB/BSA mit 0,38mg/ml EDTA (≙ 1mM) und 8ug/ml Neuraminidase

Lösung 7 : Ca-und Mg-freies KRB/BSA

Lösung 8 : KRB/BSA, jedoch mit veränderter Ca- und BSA-Konzentration: 14ug/ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
5mg/ml BSA

Lösung 9 : KRB/BSA, jedoch mit veränderter BSA-Konzentration: 40mg/ml BSA

Nach Beendigung der Hypophysenpräparation läßt man die Gewebestücke auf den Boden des Zentrifugenglases sinken und saugt im folgenden die überstehende KRB/BSA-Lösung mit Hilfe einer Pasteurpipette ab. Die entfernte Flüssigkeit wird ersetzt durch 10ml Lösung 2. Die Gewebsstücke und das Medium sind in einen Erlenmeyerkolben (100ml) zu überführen. Es folgt eine Inkubationsphase von 15 Minuten bei 37°C in einem Schüttler-Wasserbad mit einer Schüttelfrequenz von ca.60-70/min. Nach Beendigung der Typsininkubation wird 10ml Lösung 3 hinzugefügt, und das Ganze in ein konisches Zentrifugenglas überführt. Die DNAse-Behandlung ist notwendig, da verhindert werden soll, daß die Gewebsstückchen nach der Trypsin-Inkubation durch DNA/Histon-Material, das von zerstörten Zellen stammt, zusammenkleben. Sie wird solange durchgeführt, bis die Gewebsstückchen frei zum Boden des Gefäßes sinken (ca.2min). Man entfernt das überstehende Medium und ersetzt es durch 10ml auf 37°C vorgewärmte Lösung 4. Eine 5-minutige Inkubation in einem auf 37°C erwärmten Wasserbad schließt sich an. Man läßt die Gewebsstückchen erneut absinken und ersetzt das Medium durch 10ml Lösung 5. Die Inkubation erfolgt bei 37°C im Wasserbad für 5 Minuten. Erneut läßt man

die Gewebsstücke zum Boden des Zentrifugenglases sinken und ersetzt das überstehende Medium durch 4ml Lösung 6. Die Gewebsstücke und das Medium werden erneut in einen Erlenmeyerkolben überführt und für 15 Minuten in einem Schüttler-Wasserbad bei 37°C mit einer Schüttelfrequenz von 60-70/min inkubiert. Nach diesem letzten Inkubationsschritt führt man die Gewebsstückchen zusammen mit dem Medium erneut in ein konisches Zentrifugenglas über, läßt das Gewebe auf den Grund des Gefäßes sinken und entfernt das überstehende Medium. Um Enzym- und EDTA-Reste zu entfernen, folgt eine dreimalige Waschung mit je 20ml Lösung 7 nach erwähntem Prinzip: Gewebsstücke absetzen lassen - Überstand mit einer Pasteurpipette absaugen - erneutes Hinzufügen von Medium.

Trotz der beschriebenen Prozedur bleiben die Gewebsblöcke bis zu diesem Schritt intakt, wodurch der Zellverlust gering bleibt.

Mit einer an ihrer Spitze über dem Bunsenbrenner abgerundeten Pasteurpipette wird das Gewebe nun in Zellen zerteilt. Das geschieht durch wiederholte Aspiration und Exspiration der Gewebsstücke. Den Erfolg der Zelltrennung erkennt man an einer Trübung des Mediums. Ist diese eingetreten, läßt man verbliebene Gewebsstücke absetzen und überführt die überstehende Zellsuspension in 10ml Lösung 8. Zu den verbliebenen Gewebsstücken fügt man erneut etwas Lösung 7 hinzu und führt die beschriebene Zelltrennungsprozedur etwas forcierter fort, bis sämtliches Gewebe getrennt ist. Um störendes Material, wie kleine Kapillarstücke, Zelltrümmer etc. zu entfernen, unterschichtet man die Zellsuspension mit ca. 10ml Lösung 9 und zentrifugiert die Zellen durch diese Schicht für ca. 10 Minuten mit 400g. Auf diese Weise sammeln sich die Zellen am Boden des Zentrifugenröhrchens, sodaß überstehendes Medium entfernt werden kann, und die Zellen in 5ml unten beschriebenen Zellkulturmediums (s.3.2.2.5) resuspendiert werden können.

Übersicht über die Schritte der Hypophysenzelltrennung nach HOPKINS und FARQUHAR (1973):

- Hypophysenpräparation, Gewebestücke in 20 ml KRB/BSA (KRB mit 3mg/ml BSA)
- Trypsin (1mg/ml) in 10ml KRB/BSA; 15min bei 37°C im Schüttelbad
- DNAse (2ug/ml) in 10ml KRB/BSA; 2min bei 37°C
- Trypsin-Inhibitor (1mg/ml) in 10ml KRB/BSA; 5min bei 37°C
- EDTA (2mM) in Ca-und Mg-freiem KRB/BSA; 5min bei 37°C
- Neuraminidase (8ug/ml), EDTA (1mM) in Ca-und Mg-freiem KRB/BSA; 15min bei 37°C im Schüttelbad
- dreimaliges Waschen mit Ca-und Mg-freiem KRB/BSA
- Zelltrennung mit Hilfe einer Pasteurpipette
- Überführen der Zellsuspension in KRB/BSA mit 14ug/ml $CaCl_2 \cdot H_2O$ und 5mg/ml BSA
- Zentrifugation der Zellsuspension bei 400g für 10min durch Schicht von KRB/BSA mit 40mg/ml BSA
- Resuspendierung der Hypophysenzellen in 5ml Zellkulturmedium (s.3.2.2.5.)

B. Methode nach DENEF et al. (1976)

Diese Zelltrennungsmethode entspricht in seinem Prinzip der oben beschriebenen Methode nach HOPKINS und FARQUHAR (1973), jedoch mit drei wesentlichen Änderungen:

1. Die Trypsinkonzentration ist 5-mal so hoch (5mg/ml anstatt 1mg/ml)

2. Der 15-minütige Inkubationsschritt mit Neuraminidase und EDTA in Ca-und Mg-freiem KRB/BSA (Lösung 6) wird durch eine entsprechend lange Inkubation nur mit EDTA (1mM) in Ca-und Mg-freiem KRB/BSA ersetzt. Somit findet Neuraminidase bei dieser Methode keine Anwendung.

3. Die DNAse-Konzentration ist doppelt so hoch (4ug anstatt 2ug/ml)

3.2.2.4. Zellzahl und Überlebensrate

Nach Resuspendierung der Hypophysenzellen in 5ml Zellkulturmedium (s.3.2.2.3.) wurde die Zellzahl in dieser Suspension in einer Neubauer-Zählkammer unter lichtmikroskopischer Vergrößerung bestimmt.
Die Überlebensrate der Hypophysenzellen wurde nach Färbung mit Trypan-Blau bestimmt (TENNANT,1964). Lebende Zellen mit intakter Zellmembran sind in der Lage, das Eindringen des Farbstoffes Trypan-Blau in die Zelle zu verhindern, wogegen Zellen mit geschädigter Zellmembranfunktion diese Fähigkeit nicht besitzen. Es werden folglich nur tote oder stark geschädigte Zellen mit Trypan-Blau angefärbt.
0,5%-ige Trypanblau-Lösung wurde mit der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 gemischt. Nach 5 Minuten ließen sich die angefärbten Zellen unter lichtmikroskopischer Vergrößerung

in einer Neubauer-Zählkammer auszählen. Unter Berücksichtigung der Gesammtzellzahl erhielt man die Rate der abgestorbenen Zellen bzw. die Überlebensrate (MANFORD and PATTERSON, 1979).

3.2.2.5. Zellkultur

- Gefäße

Als Kulturgefäße fanden Multiwell-Kulturplatten Anwendung, die pro Platte Raum für 24 Zellkulturen bieten.
In einem Teil der Versuche wurden die Kulturgefäße zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet, um eine gute Anheftung der Hypophysenzellen an die Gefäßoberfläche zu gewährleisten. Die Wirkung von Polylysin wird verständlich, wenn man weiß, daß eine positive Ladung auf der Oberfläche eines Kulturgefäßes die Anheftung von Zellen in Kultur an diese Oberfläche fördert, da diese selbst eine negative Ladung auf ihrer Zelloberfläche tragen (MACIEIRA-COELHO and AVRAMEAS,1972). Mit solch einer positiven Ladung kann eine Gefäßoberfläche durch die Beschichtung mit Polylysin versehen werden (MAZIA et al.,1975). Die Kulturgefäße.wurden mit einer 0,1%-igen Poly-L-Lysin-Lösung benetzt. Nach 5 Minuten wurde diese mit einer Pasteurpipette entfernt, wobei dieses mit besonderer Sorgfalt zu geschehen hatte, da frei gelöstes Polylysin hemmend auf den Zellstoffwechsel wirken kann (Mc KEEHAN and HAM,1976). Es folgte eine Spülung mit sterilem Aqua destillata. Nach dessen Entfernung ließ man Flüssigkeitsreste eintrocknen.

- Kulturmedium

Als Grundbestandteil des Zellkulturmediums diente "Dulbecco modified Eagleś medium"(DMEM; DULBECCO and FREEMAN,1959), das sich für dieses Kultur- und Assaysystem als geeignet

erwiesen hatte (BAKER et al.,1978 ; LABRIE et al.,1978 ; SCOTT et al.,1980). Ergänzt wurde das Medium in Anlehnung an EDDIE et al. (1979) in folgender Weise:

1,34 g DMEM-Pulver
0,168g $NaHCO_3$ (≙20mM)
0,238g Hepes (N-2-Hydroxyäthylpiperazyl-N'-2-äthansulfonsäure), ≙10mM

ad 100ml mit Aqua dest.

dazu:
5ml Pferde-Normalserum
2,5ml Fötales Kälberserum
1ml Nicht-Essentielle-Aminosäure-Lösung
Penizillin G (100ug/ml)
Streptomycin (100ug/ml)
Amphotericin B (2,5ug/ml)
Doxicyclin (20ug/ml)
bzw. Chloramphenicol (5ug/ml)
bzw. Polymyxin B (50ug/ml)

begast mit CO_2/Luft (5%), 37°C

Das DMEM wurde in seinem $NaHCO_3$-Gehalt (20mM) gegenüber dem von DULBECCO und FREEMAN (1959) beschriebenen Originalgehalt (33mM) reduziert. Dieses machte eine Begasung mit einem 5%-igen CO_2/Luft-Gemisch anstatt einem 10%-igen Gemisch möglich, um einen pH-Wert von ca. 7,3 zu erreichen. Bei diesem pH-Wert hat Hepes seine größte Pufferkapazität, sodaß nur geringe pH-Wert-Schwankungen zu erwarten waren.

Besondere Beachtung ist der richtigen Osmolarität eines Zellkulturmediums zu schenken. Sie lag in dieser Medienzusammensetzung bei einer Messung mit Hilfe der Methode der Gefrierpunktserniedrigung bei 304 mOs/kg und damit innerhalb des für Säugetierzellen in Kultur geeigneten Bereiches von ca. 275-325 mOs/kg (HAM and Mc KEEHAN,1979).

Vor der Verwendung wurde das Medium sterilfiltriert (Zellulosefilter 0,22um).
Trotz Einhaltung steriler Bedingungen und Verwendung steriler Instrumente und Medien erwies sich der Schutz der Zellkulturen vor bakterieller Kontamination als schwierig.
Die meist empfohlene Antibiotikakombination für Zellkulturen, nämlich Penizillin G und Streptomycin (PERLMAN,1979), bot keinen ausreichenden Schutz. In den Fällen, in denen es trotz Penizillin- und Streptomycinanwendung zu bakterieller Kontamination kam, zeigten sich als Erreger ausschließlich gramnegative Keime, vornehmlich aus der Pseudomonas-Gruppe. Aus diesem Grund wurde ein drittes, im gramnegativen Bereich wirksames Antibiotikum hinzugefügt. Polymyxin B und Chloramphenicol erwiesen sich trotz guter Empfindlichkeit der Erreger im Antibiogramm als weniger geeignet, da sie in der für Zellkulturen empfohlenen Dosis von 50ug/ml bzw. 5ug/ml (PERLMAN,1979) nicht in der Lage waren, bakterielle Kontamination zu verhindern. Als sinnvoll erwies sich die Kombination von Penizillin/Streptomycin mit Doxycyclin (20ug/ml), die bei guter Empfindlichkeit der Erreger ein bakterielles Wachstum zu verhindern vermochte.
Eine Kontamination der Zellkulturen mit Pilzen konnte mit Amphotericin B (2,5ug/ml) wirksam verhindert werden.

- Kulturbedingungen

In jedem Versuchsansatz wurden 48 Zellkulturen mit je 0,9ml Zellkulturmedium angelegt. 100ul der Hypophysenzellsuspension wurde hinzugefügt.
Der Zellgehalt der einzelnen Hypophysenzellkultur schwankte von Ansatz zu Ansatz je nach Ausbeute der Zellpräparation zwischen 95 000 und 230 000. Die Schwankungen von Kultur zu Kultur waren jedoch innerhalb eines Versuchsatzes unter 10%.
Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C unter Begasung mit einem

5%-igen CO_2/Luft-Gemisch inkubiert. Ein Wechsel des Kulturmediums fand jeweils spätestens nach vier Tagen statt.

3.2.2.6. Inhibin-Assay-Aufbau

Die Hypophysenzellen wurden unter obengenannten Bedingungen jeweils für die Dauer von einem Tag inkubiert, um ihnen die Möglichkeit zu geben, sich an den Boden des Kulturgefäßes anzuheften.
Am zweten Tag wurde die Inhibin-Testlösung hinzugefügt. Zur Erlangung einer Dosis/Wirkungs-Kurve erhielten 40 der 48 Zellkulturen 100ul Inhibin-Testlösung in verschiedenen Konzentrationen. Jede Inhibin-Konzentration der Verdünnungsreihe wurde in mindestens drei Zellkulturen getestet. Die restlichen acht Zellkulturen erhielten jeweils 100ul Kulturmedium. Die Inkubation wurde weitere drei Tage unter oben beschriebenen Bedingungen weitergeführt.
Am fünften Tag wurde jeweils das Medium entfernt. Die 40 Zellkulturen, die zuvor die Inhibin-Testlösung erhalten hatten, erhielten erneut 100ul Inhibin-Testlösung in gleicher Konzentration wie zuvor und jeweils 1ml Zellkulturmedium, zusätzlich synthetisches LHRH (50nM). Von den restlichen acht Zellkulturen, die zuvor kein Inhibin erhalten hatten, erhielten fünf Kulturen jeweils 1,1ml Kulturmedium mit LHRH (50nM) und drei Kulturen jeweils 1,1ml Kulturmedium ohne LHRH.
Nach einer weiteren 6-stündigen Inkubation wurde das Kulturmedium gesammelt und bis zur FSH-Bestimmung bei -20°C gelagert.
Eine dreitägige Vorinkubation mit Inhibin-Testsubstanz ist notwendig, da eine alleinige 6-stündige Inkubation mit Inhibin keine befriedigende Hemmung der LHRH-induzierten FSH-Ausschüttung bei kultivierten Hypophysenzellen liefert, sondern diese mit der Dauer der Inhibineinwirkung zunimmt und nach 3 Tagen ihr Maximum erreicht hat (SCOTT and BURGER,1981a).

Übersicht über die Schritte des Inhibin-Assays mit Hypophysenzellkulturen:

- 1.Tag: Hypophysenzellpräparation
  Überführen der Zellen in Kulturmedium
  48 Zellkulturen
  Inkubation für 1 Tag bei 37°C und Begasung mit
  5%-igem CO_2/Luft-Gemisch

- 2.Tag: Kultur 1-40: + 100ul Inhibin-Testlösung mit verschiedenen Konzentrationen einer Inhibin-Verdünnungsreihe
  Kultur 41-48: + 100ul Kulturmedium
  Inkubation für 3 Tage bei 37°C und Begasung mit
  5%-igem CO_2/Luft-Gemisch

- 5.Tag: Kultur 1-40: Medium entfernen
  + 100ul Inhibin-Testlösung mit verschiedenen Konzentrationen einer Inhibin-Verdünnungsreihe
  + 1ml Kulturmedium
  + LHRH (50nM)
  Kultur 41-45: Medium entfernen
  + 1,1ml Kulturmedium
  + LHRH (50nM)
  Kultur 46-48: Medium entfernen
  + 1,1ml Kulturmedium
  Inkubation für 6 Stunden bei 37°C und Begasung mit
  5%-igem CO_2/Luft-Gemisch

  Medium sammeln, FSH-Bestimmung im Medium

3.2.2.7. Ergänzende Versuche zum Inhibin-Assay mit Hypophysenzellkulturen

- Effekt der Polylysin-Beschichtung der Kulturgefäße auf die Hypophysenzellen

Wie bereits erwähnt (s.3.2.2.5.), bewirkt die Beschichtung von Kulturgefäßoberflächen mit Polylysin eine bessere Anheftung von Zellen (MAZIA et al.,1975) und erleichtert dadurch den Umgang mit den Zellkulturen wesentlich (z.B. geringer Zellverlust bei Mediumwechsel).
Um eine eventuelle toxische Wirkung des Polylysins auf die Zellen auszuschließen, wurde untersucht, ob diese Beschichtung einen Einfluß auf die Fähigkeit isolierter Rattenhypophysenzellen hat, in das Kulturmedium FSH auszuschütten. Dabei wurde sowohl die spontane als auch die LHRH-induzierte FSH-Ausschüttung untersucht.
Die Hypophysen von 12 Ratten wurden hierzu nach oben beschriebener Methode (DENEF et al.,1976) in Einzelzellen getrennt. Es folgte eine 3-tägige Kultivierung der Hypophysenzellen unter oben beschriebenen Bedingungen, wobei die Hälfte der Zellen auf 12 Kulturgefäße verteilt wurden, die zuvor mit Polylysin beschichtet worden waren, die andere Hälfte auf 12 unbeschichtete Kulturgefäße (s.3.2.2.5.). Am 4.Tag entfernte man das Kulturmedium und lagerte es bis zur FSH-Bestimmung bei -20°C. In jeweils 6 Kulturen einer jeden Gruppe wurde das entfernte Medium ersetzt durch solches, das LHRH (50nM) enthielt. Die restlichen Kulturen erhielten Medium ohne LHRH. Nach einer 6-stündigen Inkubation wurde das Medium gesammelt und bis zur FSH-Bestimmung bei -20°C gelagert.

- Abhängigkeit der Vitalität und Stimulierbarkeit von kultivierten Rattenhypophysenzellen vom Alter der Kultur

Voraussetzung für das Funktionieren des oben beschriebenen Inhibin-Assays (s.3.2.2.6.) ist das Überleben isolierter Rattenhypophysenzellen in Kultur für 4 Tage. Das folgende

Experiment sollte klären, ob diese Voraussetzung gegeben ist. Als Zeichen der Vitalität wurde untersucht, in welchem Ausmaß sich die Zellen an jedem Tag einer 4-tägigen Kultivierung mit Vitalfarbstoffen anfärben lassen, und wie sich die Stimulierbarkeit der FSH-Ausschüttung durch LHRH in dieser Zeit verändert.

Um zu erfahren, bei welcher LHRH-Konzentration eine maximale Stimulation erreicht wird, und ob diese während der Inkubationsdauer konstant bleibt, fanden verschiedene LHRH-Konzentrationen Verwendung. Eine maximale Stimulation der FSH-Ausschüttung erreicht man bei intakten Hypophysenzellen in Kultur mit einer LHRH-Konzentration von ca. 50-100nM (BAKER et al.,1976 ; LABRIE et al.,1978 ; DE JONG et al., 1979 ; STEINBERGER,1979). Um zu untersuchen, ob sich die FSH-Ausschüttung mit noch höheren LHRH-Konzentrationen weiter steigern läßt, wurden die Hypophysenzellen entweder mit 100nM, 500nM oder 1000nM LHRH stimuliert. Hierzu wurden die Hypophysen von 20 Ratten nach der Methode von HOPKINS und FARQUHAR (1973) in Einzelzellen getrennt, auf 48 Kulturgefäße verteilt und unter oben beschriebenen Bedingungen (s.3.2.2.5.) kultiviert.

Am 2.Tag blieben 36 Kulturen unbeeinflußt. Dagegen wurde das Medium aus 12 Kulturen entfernt und bis zur FSH-Bestimmung bei -20°C gelagert. Es folgte eine 6-stündige Stimulationsphase, wobei jeweils 3 Kulturen Medium mit 100nM, 500nM und 1000nM LHRH erhielten. Die verbliebenen 3 Kulturen erhielten Medium ohne LHRH. Nach Beendigung dieser Inkubation wurde das Medium aus den 12 Kulturen gesammelt und bis zur FSH-Bestimmung bei -20°C gelagert.

Zur Ermittlung der Überlebensrate wurden die auf den Gefäßböden haftenden Hypophysenzellen mit Trypsinlösung (1mg/ml) bis zu deren Ablösung (ca. 5min.) behandelt (HAM and Mc KEEHAN,1979), sodann mit einer Pasteurpipette gesammelt und mit ca. 400g zentrifugiert. Nach Entfernung der überstehenden Lösung wurden die Zellen in 0,9ml Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer (KREBS,1950) resuspendiert. Die Vitalfärbung mit Trypanblau wurde sodann in bereits beschriebener Weise (s.3.2.2.4.) durchgeführt. Nach Zufügen von 0,1ml

0,5%-iger Trypanblau-Lösung konnte man nach 5 Minuten in einer Neubauer-Zählkammer das Verhältnis von toten Zellen zur Gesammtzellzahl ermitteln.
Entsprechend verfahren wurde am 3.Tag: Von den verbliebenen 36 Kulturen wurden 12 Kulturen in beschriebener Weise behandelt, und 24 Kulturen blieben unbeeinflußt. In gleicher Weise wurde am 4. und 5.Tag verfahren.

3.2.3. Assay mit Hypophysenhälften

3.2.3.1. Prinzip und Vorgehen

Die Verwendung von kultivierten Rattenhypophysenhälften in einem Bioassay zur Klärung endokrinologischer Fragen geht zurück auf SAFFRAN und SCHALLY (1955). Als erste versuchten DAVIS et al. (1978), Inhibin mit Hilfe dieser Methode zu messen.

Im folgenden Experiment sollte die Fähigkeit dieser Methode untersucht werden.
Die Hypophysen männlicher, 120 Tage alter Ratten wurden in bereits beschriebener Weise (s.3.2.2.2.) entnommen. Mit Hilfe einer sterilen Rasierklinge wurden sie längs gespalten, wobei darauf zu achten war, daß jeweils zwei ungefähr gleich große Gewebestücke entstanden. Jede Hypophysenhälfte wurde getrennt kultiviert. Als Kulturmedium fand Leibovitz-Medium (LEIBOVITZ,1963) Anwendung. Da dieses Medium Bikarbonat-frei ist, erübrigt sich eine Begasung mit einem CO_2/Luft-Gemisch zur Erreichung eines physiologischen pH-Wertes. Es eignet sich deshalb für Inkubationsbedingungen, die eine CO_2/Luft-Begasung nicht zulassen. Das Medium wurde in folgender Weise ergänzt:

- Leibovitz-Medium
- Pferde-Normalserum (50ul/ml)
- Fötales Kälberserum (25ul/ml)
- Nicht-Essentielle-Aminosäurelösung (10ul/ml)
- Doxycyclin (20ug/ml)

. pH 7,3; 37°C

Nach einer halbstündigen Vorinkubation wurde das Medium durch frisches ersetzt, und es folgte die eigentliche 4-stündige Meßphase. Jeweils die eine Hälfte jeder Hypophyse erhielt 1ml Medium mit LHRH (10nM), die andere Hälfte erhielt 0,9ml Medium, 0,1ml der Follikelflüssigkeit-Inhibin-

Testlösung (unverdünnt) und LHRH (10nM). Nach Beendigung der Inkubation wurde das Medium gesammelt und bis zur FSH-Bestimmung bei -20°C gelagert.
Die Inhibinwirkung wurde aus dem Vergleich der FSH-Konzentration im Medium der Kulturen aus jeweils zusammengehörigen Hypophysenhälften geschlossen.

3.2.3.2. Ergänzende Untersuchungen

Ergänzend zu dem oben beschriebenen Inhibin-Assay mit Hypophysenhälften wurden Untersuchungen durchgeführt, die seine Arbeitsweise und mögliche Fehlerquellen durchsichtig machen sollten.
So wurde untersucht, inwieweit sich beide Hälften einer Hypophyse biologisch gleich verhalten, was ja die Voraussetzung zum Funktionieren der beschriebenen Assay-Methode darstellt.
Dazu erhielten alle Kulturen nach einer halbstündigen Vorinkubation frisches Kulturmedium. Nach weiteren 4 Stunden wurde das Medium einer jeden Gewebekultur entnommen. Daraufhin wurde untersucht, inwieweit sich die FSH-Konzentration in den Medien aus Kulturen zusammengehöriger Hypophysenhälften unterschied.
In einem zweiten Versuchsansatz wurde entsprechend verfahren, jedoch enthielt das Medium aller Kulturen während der 4-stündigen Inkubationsphase zusätzlich LHRH (10nM).
In einem weiteren Versuchsansatz sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß sich die Hypophysen der einzelnen Tiere darin unterschieden, wie die FSH-Ausschüttung durch LHRH zu stimulieren ist.
Dazu erhielt nach einer halbstündigen Vorinkubation jeweils die eine Hälfte einer jeden Hypophyse Medium mit LHRH (10nM), wogegen die andere Hälfte Medium ohne LHRH erhielt. Der Grad der Stimulation ließ sich aus dem Unterschied der FSH-Konzentration im Medium aus Kulturen zusammengehöriger Hypophysenhälften erkennen.

Weiterhin sollte die Abhängigkeit der FSH-Ausschüttung der Hypophysengewebekulturen von der Inkubationsdauer untersucht werden. Hierbei interessierte sowohl die basale wie auch die LHRH-induzierte FSH-Ausschüttung. Nach einer halbstündigen Vorinkubation erhielt so jeweils die eine Hälfte einer jeden Hypophyse Kulturmedium mit LHRH (50nM), wogegen die andere Hälfte Medium ohne LHRH erhielt. Bei jeweils einem Viertel der Kulturen wurde das Medium nach 1, 2, 3 und 4 Stunden entnommen und auf seine FSH-Konzentration untersucht.

3.2.4. Ratten-FSH-Radioimmunoassay

Das Vorgehen beim Ratten-FSH-RIA entsprach mit leichten Abänderungen der Empfehlung des "National Institut of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases; Bethesda, USA" (NIAMDD), von welchem auch das Ratten-FSH zur Jodierung, die Standardpräparation und das Anti-Ratten-FSH-Antiserum (1. Antikörper) zur Verfügung gestellt wurden.

Die beschriebene Methode ist ein Doppel-Antikörper-Radioimmunoassay zur Bestimmung von Ratten-FSH (r-FSH).
Die Jodierung des r-FSH wurde mit Hilfe der Chloramin-T-Methode (HUNTER and GREENWOOD,1962) in folgender Weise durchgeführt:

Benötigte Reagentien:

- 25ul r-FSH (2,5ug/25ul)
- 10ul Phosphatpuffer (0,5M), pH 7,4
- 5ul $Na^{125}J$-Lösung (5ul ≙ 0,5mCi)
- 10ul Chloramin-T-Lösung (0,2mg/ml)
- 30ul Natriumdisulfit-Lösung (0,2mg/ml)
- 100ul Transferlösung (PBS 0,09M; KJ 10mg/ml; BSA 20mg/ml; etwas Bromphenolblau)
- 55ml PBS (0,09M) mit BSA (10mg/ml)

Das r-FSH wird zusammen mit dem Phosphatpuffer, $Na^{125}J$-Lösung und der Chloramin-T-Lösung bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach einer Minute wird der chemische Prozess durch Natriumdisulfit gestoppt. Transferlösung wird hinzugefügt und das Ganze auf eine Sephadex-G-25-Säule überführt. Man fügt nun soviel PBS/BSA hinzu, bis die sichtbare blaue Bande das untere Ende der Säule erreicht hat. Auf diese Weise erhält man die erste Fraktion, die verworfen wird. Die zweite Fraktion erhält man durch Zufügen weiteren PBS/BSA, bis die blaue Bande vollständig eluiert ist. In dieser zweiten Fraktion befindet sich das gewünschte ^{125}J-r-FSH. Es wird bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Die Säule wird

im folgenden mit ausreichend PBS/BSA gespült, um nicht gebundenes ^{125}J zu entfernen.

Der 1. Antikörper (Anti-Ratten-FSH-Antiserum vom Kaninchen) wird vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 mit PBS/BSA verdünnt und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Das eigentliche r-FSH-Radioimmunoassay wurde in folgender Weise durchgeführt:

Benötigte Reagentien:

- A: PBS (0,09M) mit BSA (10mg/ml) und NaN_3 (0,2mg/ml)
- B: PBS (0,01M) mit EDTA (0,05M), NaN_3 (0,5mg/ml) und Kaninchen-Normalserum (20ul/ml)
- C:(Tracer): B mit ^{125}J-r-FSH, sodaß 20000 - 25000 cpm/300ul
- D:(1.Ak/Tracer): Die 1:10-Verdünnung des 1.Antikörpers wird mit C im Verhältnis 1:375 verdünnt
- E:(2.Ak): Anti-Kaninchenimmunglobulin-Antiserum vom Esel wird mit A im Verhältnis 1:10 verdünnt

Pipettierschema für jedes einzelne Zählröhrchen:

1. Probe (max. 300ul) bzw. r-FSH-Standardreferrenzpräparation
2. Lösung A ad 300ul
3. Lösung D (300ul)

- schütteln, Inkubation für 24 Stunden bei Raumtemperatur
- Lösung E (200ul) dazu, schütteln, Inkubation für 24 Stunden bei Raumtemperatur
- Zentrifugieren (3000g, 30min), Überstand absaugen, Präzipitat mit 1ml Lösung A waschen, zentrifugieren (3000g, 25min), Überstand absaugen, Gammastrahlung im Zähler messen

Die Proben wurden so verdünnt, daß ihr zu erwartende FSH-Gehalt im optimalen Meßbereich von ca. 50-250ng lag. Jede Probe wurde dreifach bestimmt.
Die Standardkurve umfaßte den Bereich von 10-500ng FSH. Alle Punkte der Standardkurve wurden dreifach bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach der Logit-Log-Transformation.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Inhibinassay mit Hypophysenzellkulturen

3.3.1.1. Hypophysenzellpräparation und Kulturbedingungen

- Vergleich der Hypophysenzelltrennungsmethode nach HOPKINS und FARQUHAR (1973) mit der nach DENEF et al. (1976)

Es zeigte sich, daß die Zellausbeute mit der Methode nach DENEF et al. wesentlich höher, als mit der Methode nach HOPKINS und FARQUHAR war (s. Tab.1).

HOPKINS und FARQUHAR	DENEF et al.
315 000 Zellen/Hypophyse	389 000 Zellen/Hypophyse
250 000 "	473 000 "
333 000 "	575 000 "
240 000 "	525 000 "
250 000 "	
213 000 "	
249 000 "	
390 000 "	

Tab.1: Zellausbeute/Hypophyse in verschiedenen Versuchsansätzen mit zwei Zelltrennungsmethoden

Der Unterschied der beiden Gruppen ist bei Mittelwerten von 280 000 bzw. 490 000 Zellen/Hypophyse nach dem Mann-and-Whitney-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% hoch signifikant.
Als weiteres Kriterium der Güte der Zelltrennungsmethode wurde die Absterberate der Zellen unmittelbar nach dem Trennungsschritt untersucht. Hierbei ergab sich, daß mit der Methode von HOPKINS und FARQUHAR wesentlich mehr Zellen abgestorben waren, als mit derjenigen von DENEF et al. (s.Tab.2).

HOPKINS und FARQUHAR	DENEF et al.
44%	24%
41%	32%
	28%
	27%

Tab.2: Absterberate von Hypophysenzellen nach der Zelltrennungsprozedur mit zwei verschiedenen Methoden

Die Ergebnisse sind bei Mittelwerten von 42,5% bzw. 27,7% und Standardabweichungen von ± 2,1% bzw. ± 3,3% nach dem T-Test für unverbundene Stichproben mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% hochsignifikant unterschiedlich.

- Effekt einer Polylysin-Beschichtung von Kulturgefäßen auf kultivierte Hypophysenzellen

Schon vom mikroskopischen Aspekt der Zellen ließ sich ein deutlicher Effekt der Beschichtung der Kulturgefäße mit Polylysin erkennen.
Unmittelbar nach der enzymatischen Zelltrennung waren die Zellen rund und einzeln im Medium suspendiert (s.Abb.1). Am 4.Tag der Kultivierung in unbeschichteten Kulturgefäßen waren die Zellen miteinander verklumpt und hafteten unzureichend am Gefäßboden, sodaß ein großer Zellverlust bei einem Mediumwechsel unvermeidbar war (s.Abb.2). Im Gegensatz hierzu wuchsen die Zellen in Polylysin-beschichteten Kulturgefäßen bis zum 4.Tag zipfelig aus und überzogen festhaftend zum Teil rasenartig den Gefäßboden (s.Abb.3).
Darüberhinaus war ein toxischer Effekt des Polylysins auf die FSH-Kinetik der Hypophysenzellen nicht nachweisbar. Das war daran erkennbar, daß sich kein signifikanter Unterschied der FSH-Konzentration im Medium von Zellkulturen mit Polylysin-beschichteten gegenüber denen mit unbeschichteten Kulturgefäßen ergab. Dieses zeigte sich sowohl bei Messungen nach einer initialen 3-tägigen Kultivierung (s.Tab.3) als

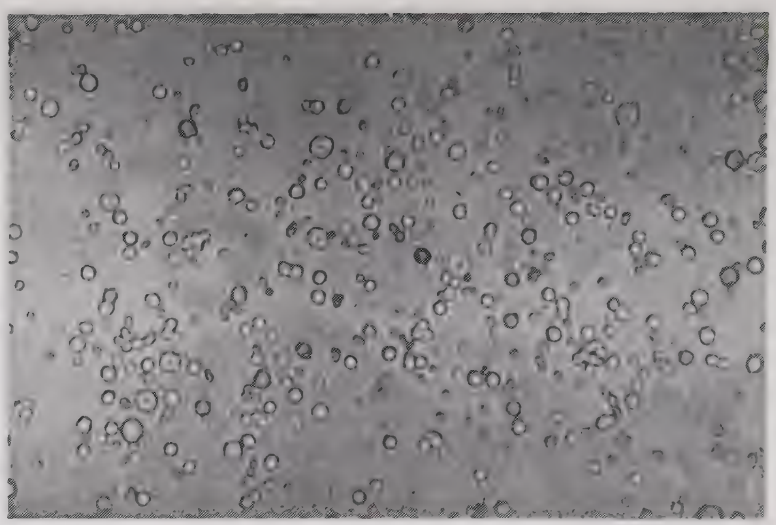

Abb.1: Rattenhypophysenzellen unmittelbar nach der enzymatischen Zelltrennung (Vergr. 100-fach)

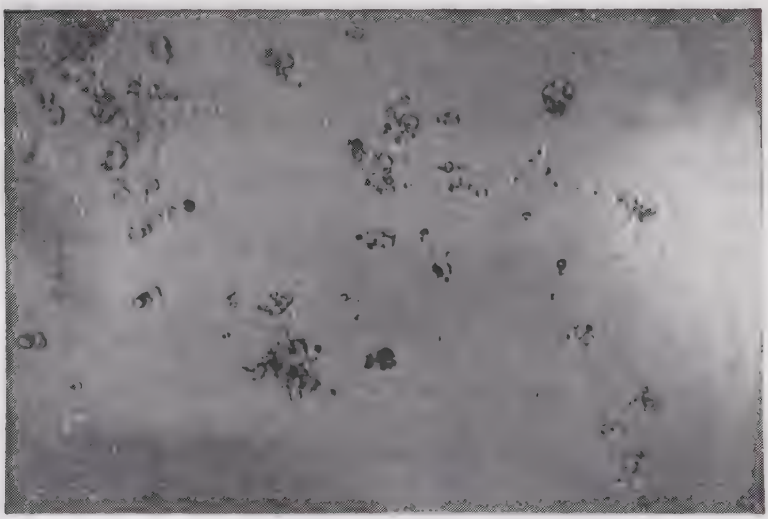

Abb.2: Rattenhypophysenzellen nach 3-tägiger Kultivierung in unbeschichtetem Kulturgefäß (Vergr. 100-fach)

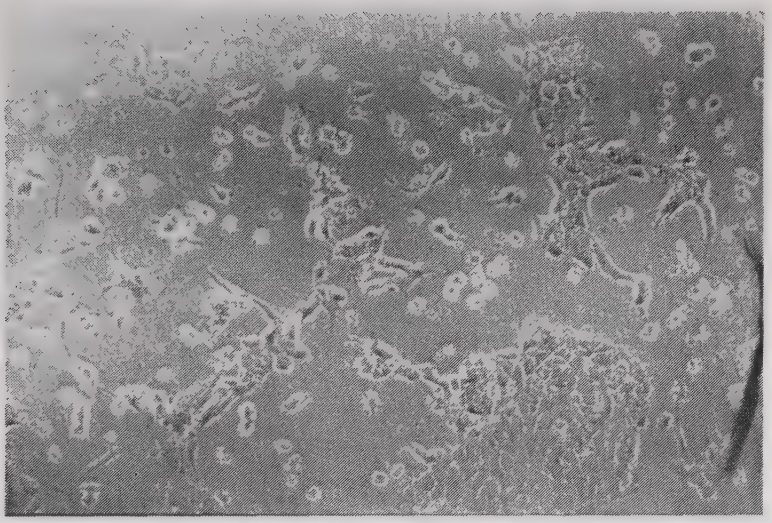

Abb.3: Rattenhypophysenzellen nach 3-tägiger Kultivierung in Polylysin-beschichtetem Kulturgefäß (Vergr. 100-fach)

Polylysin-beschichtet	unbeschichtet
851 ng/ml	625 ng/ml
606 "	521 "
271 "	491 "
657 "	449 "
535 "	620 "

Tab.3: FSH-Konzentration im Medium von jeweils 5 Hypophysenzellkulturen nach 3-tägiger Inkubation in Polylysin-beschichteten bzw. unbeschichteten Kulturgefäßen

	Polylysin-beschichtet	unbeschichtet
o. LHRH	134 ng/ml	119 ng/ml
	120 "	64 "
	116 "	72 "
	57 "	77 "
	78 "	66 "
	104 "	157 "
m. LHRH (50nM)	254 "	366 "
	220 "	410 "
	273 "	341 "
	293 "	72 "
	346 "	376 "
	251 "	299 "

Tab.4: FSH-Konzentration im Medium von Hypophysenzellkulturen nach 6-stündiger Inkubation am 4.Tag der Kultur

auch nach der 6-stündigen LHRH-Stimulationsphase am 4. Tag (s.Tab.4).

Die Ergebnisse der beiden Gruppen der Tabelle 3 sind bei Mittelwerten von 584 ng/ml bzw. 541 ng/ml und Standardabweichungen von $\pm$ 210 ng/ml bzw. 78 ng/ml nach dem T-Test für unverbundene Stichproben bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% identisch.

Entsprechende Aussagen lassen sich zu den Ergebnissen der Tabelle 4 machen. Die FSH-Werte in den beiden Gruppen ohne LHRH sind bei Mittelwerten von 101 ng/ml bzw. 92 ng/ml und Standardabweichungen von $\pm$ 34 ng/ml bzw. 37 ng/ml identisch (Irrtumswahrscheinlichkeit 5%). Entsprechendes gilt für die Zellkulturen mit LHRH bei Mittelwerten von 272 ng/ml bzw. 310 ng/ml und Standardabweichungen von $\pm$ 48 ng/ml bzw. $\pm$ 122 ng/ml.

- Abhängigkeit der Überlebensrate und Stimulierbarkeit kultivierter Ratten-Hypophysenzellen vom Alter der Kultur

Die Vitalfärbung der Hypophysenzellen ergab bei einem Versuchsansatz folgendes Ergebnis:
Unmittelbar nach der enzymatischen Zelltrennung waren 44% der Zellen tot. Diese Rate lag am 2.Inkubationstag bei 34%. Am 3., 4. und 5. Inkubationstag waren die Absterberaten mit 16%, 18% und 12% in etwa identisch.
Eine unzureichende Haftung der Zellen am Gefäßboden zeigte sich am 2. Inkubationstag, da ca. 20% der Zellen beim Mediumwechsel mitentfernt wurden (bei diesem Versuchsansatz waren unbeschichtete Kulturgefäße verwendet worden). Am 3., 4. und 5. Inkubationstag lag die Verlustrate bei jeweils ca. 10%.
Entsprechende Auszählungen bei Verwendung von Polylysin-beschichteten Kulturgefäßen ergaben Werte von unter 5%.

Über die FSH-Ausschüttung der Hypophysenzellen innerhalb der ersten 4 Inkubationstage gibt die Tabelle 5 Auskunft. Es werden die FSH-Konzentrationen im Medium von Kulturen angegeben, die ohne LHRH 1, 2, 3 bzw. 4 Tage inkubiert wurden. Die angegebenen Werte entsprechen folglich der Basalsekretion der Hypophysenzellen. Sie stellen die Mittelwerte aus jeweils 12 Zellkulturen dar.

Inkubationszeitpunkt	$\bar{x}$ FSH-Konzentration
2. Tag	480 ng/ml
3. Tag	555 ng/ml
4. Tag	608 ng/ml
5. Tag	629 ng/ml

Tab.5: FSH-Konzentration im Medium kultivierter Hypophysenzellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Basalsekretion)

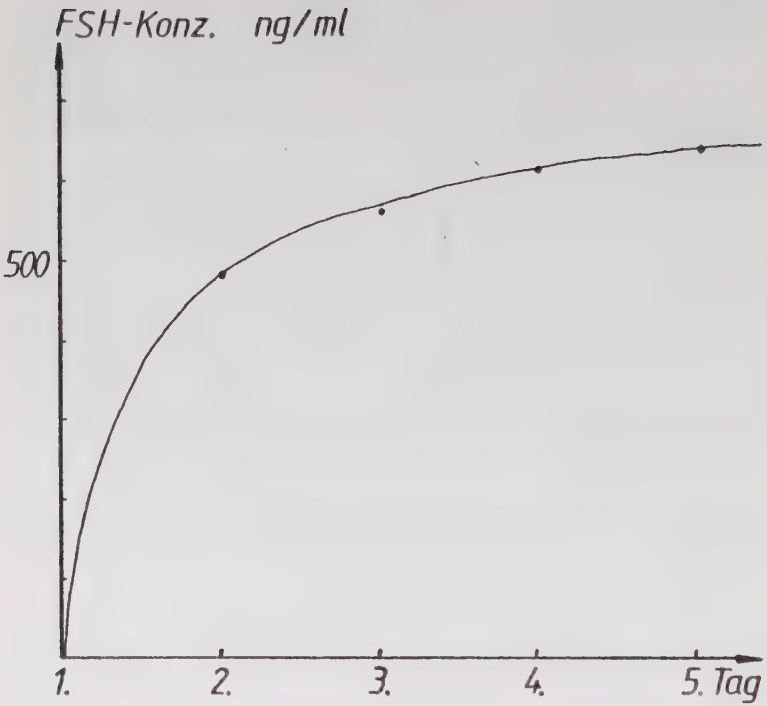

Abb.4: siehe Tabelle 5

Die Tabelle 6 gibt die Ergebnisse der an verschiedenen Inkubationstagen mit unterschiedlichen LHRH-Konzentrationen durchgeführten 6-stündigen LHRH-Stimulationsphase wieder.

Die statistische Auswertung mit Hilfe der einzelfaktoriellen Varianzanalyse ergab bei Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% folgende Ergebnisse:
Zuerst wurde untersucht, ob sich die Mittelwerte der FSH-Konzentrationen bei einer bestimmten LHRH-Konzentration an den verschiedenen Inkubationstagen statistisch voneinander unterschieden. Die Mittelwerte in der Gruppe ohne LHRH, mit 500nM LHRH und mit 1000nM LHRH waren voneinander nicht

		ohne LHRH	100nM LHRH	500nM LHRH	1000nM LHRH
2.Tag		172	299 (154%)	270 (139%)	281 (144%)
		201	292 (150%)	296 (152%)	221 (113%)
		209	336 (173%)	254 (130%)	234 (120%)
	$\bar{x}$	194 (100%)	309 (159%)	273 (140%)	245 (126%)
3.Tag		131	157 (129%)	200 (165%)	374 (309%)
		106	144 (119%)	202 (166%)	256 (211%)
		128	207 (171%)	340 (251%)	270 (223%)
	$\bar{x}$	121 (100%)	169 (139%)	247 (204%)	300 (247%)
4.Tag		168	249 (171%)	256 (176%)	227 (156%)
		169	271 (186%)	270 (186%)	199 (137%)
		100	275 (189%)	327 (225%)	287 (197%)
	$\bar{x}$	145 (100%)	265 (182%)	284 (195%)	237 (163%)
5.Tag		118	194 (147%)	207 (156%)	214 (162%)
		167	249 (188%)	265 (200%)	260 (197%)
		111	277 (209%)	269 (203%)	258 (195%)
	$\bar{x}$	132 (100%)	240 (181%)	247 (187%)	244 (184%)

Tab.6: FSH-Konzentration (ng/ml) von Zellkulturmedien nach 6-stündiger LHRH-Stimulationsphase in verschieden alten Kulturen mit unterschiedlichen LHRH-Konzentrationen (jeweils 3 Hypophysenzellkulturen pro Inkubationstag und LHRH-Konzentration)

unterscheidbar. Das heißt, bei diesen LHRH-Konzentrationen war die ausgeschüttete FSH-Menge in der 6-stündigen Inkubationsphase unabhängig vom Alter der Kultur. Nur in der Gruppe mit 100nM LHRH waren die Mittelwerte nicht identisch (Prüfgröße $F_{(3,8)}$= 11,2 ; Quantil = 5,42). Hierbei war nur der Wert am 3.Tag mit 169ng/ml zu niedrieg.
Weiter wurde untersucht, ob sich die prozentuale Stimulation der FSH-Ausschüttung mit konstanten LHRH-Mengen an den verschiedenen Inkubationstagen unterschied. Die Mittelwerte der Prozentzahlen waren für die Gruppe mit 100nM LHRH und 500nM LHRH nicht unterscheidbar. Nur in der Gruppe mit 1000 nM LHRH waren die Mittelwerte nicht identisch (Prüfgröße $F_{(3,8)}$= 7,08 ; Quantil = 5,42). Hierbei lag nur der Wert am 3.Tag mit 247% zu hoch.
Weiterhin interessierte, ob sich die Mittelwerte der FSH-Konzentrationen bei einem bestimmten Alter der Kultur bei verschiedenen LHRH-Konzentrationen (100nM, 500nM, 1000nM) voneinander unterschieden. Es zeigte sich, daß die Mittelwerte innerhalb aller Kulturaltersgruppen bei den verwendeten LHRH-Konzentrationen nicht zu unterscheiden waren.

Zusammenfassend läßt sich also folgendes sagen:

1. Die FSH-Konzentrationen waren in den Kulturmedien nach 6-stündiger Inkubation mit konstanten LHRH-Konzentrationen mit Ausnahme eines Wertes unabhängig vom Alter der Kultur.

2. Das Ausmaß der Stimulation der FSH-Ausschüttung durch konstante LHRH-Mengen war mit Ausnahme eines Wertes unabhängig vom Alter der Kultur.

3. Die FSH-Konzentrationen waren in allen Kulturaltersgruppen unabhängig von der Konzentration des zugesetzten LHRHs (100nM, 500nM, 1000nM). Das heißt, die maximale Stimulation der FSH-Ausschüttung war bereits bei 100nM

LHRH erreicht und ließ sich in keinem Kulturalter durch höhere LHRH-Konzentrationen steigern.

Somit läßt sich sagen, daß innerhalb einer 4-tägigen Kultivierung das Alter der Hypophysenzellkultur nur einen geringen Einfluß auf die FSH-Ausschüttung der Zellen besitzt und am 5. Tag noch eine gute Vitalität der Zellen feststellbar ist.

3.3.1.2. Erprobung des Assays mit Inhibin-Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen einer Verdünnungsreihe

- Verwendung von Hodentubuli-Kulturmedium als Inhibin-Testsubstanz

Die Tabelle 7 und Abbildung 5 zeigen einen deutlichen Anstieg der FSH-Konzentration in den Kulturmedien mit abnehmender Inhibin-Konzentration der hinzugefügten Testlösung. Dieser Zusammenhang ist statistisch signifikant (s.u.).

Verdünnung der Inhibin-Testlsg.	$\bar{x}$ FSH-Konz. (ng/ml)	S.E.M.	% des Kontrollw. (o. Inhibin)
1:1	185	±19,5	64
1:2	202	± 4,9	70
1:4	233	±21,2	81
1:8	228	± 2,3	79
1:16	276	±17,6	96
Kontrollwert (o. Inhibin)	286	± 2,1	100

Tab.7: Abhängigkeit der FSH-Konzentration in Hypophysenzellkulturmedien von der Verdünnung der hinzugefügten Inhibin-Testlösung (Hodentubuli-Kulturmedium) ; Mittelwerte aus je 3 Kulturen

Es wurde zuerst untersucht, ob sich die FSH-Konzentrations-Mittelwerte der einzelnen Inhibin-Verdünnungsgruppen statistisch voneinander unterscheiden oder als identisch zu betrachten sind.
Die Varianzanalyse ergab eine signifikante Prüfgröße $F_{5,11}$= 6,6 bei einer Quantile von 4,04 und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Somit sind die Mittelwerte der FSH-Konzentrationen in den einzelnen Inhibin-Verdünnungsgruppen nicht

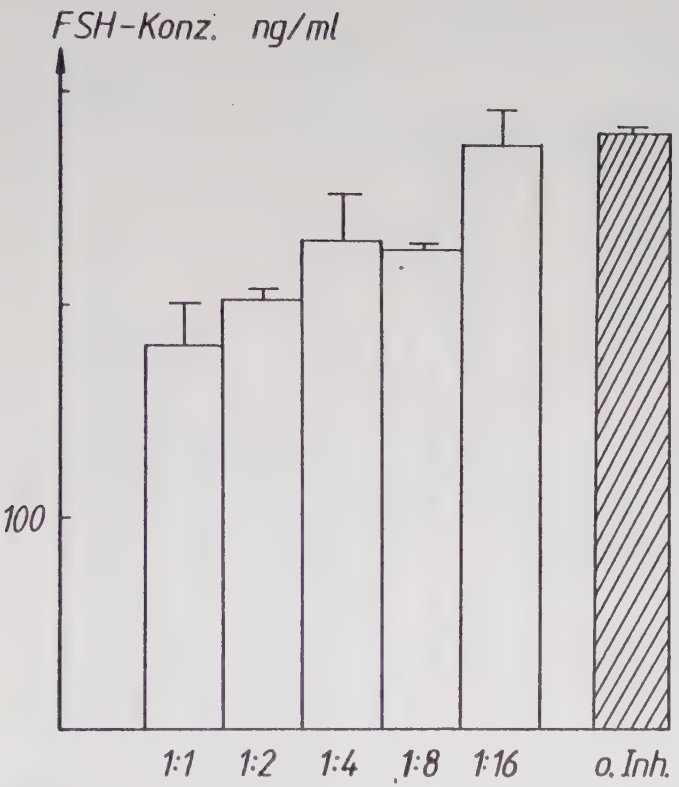

Abb.5: siehe Tabelle 7

identisch. Darüberhinaus interessierte, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen den FSH-Werten und der Inhibin-Konzentration der hinzugefügten Testlösung existiert. Die Regressionsanalyse erlaubte eine Ablehnung der Nullhypothese (Regressionskoeffizient = 0) mit einem $F_{1/n-1} = 12{,}66$ auf dem 5%-Niveau. Somit besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen der Inhibin-Konzentration der Testlösung und der FSH-Konzentration der Kulturmedien.

- Verwendung von Rinder-Follikelflüssigkeit als Inhibin-Testsubstanz (Ergebnisse aus zwei Versuchsansätzen mit identischer Inhibin-Testlösung

Die Tabelle 8 und die Abbildung 6 geben die Ergebnisse aus dem Versuchsansatz 1, die Tabelle 9 und die Abbildung 7 aus dem Versuchsansatz 2 wieder.

Versuchsansatz 1

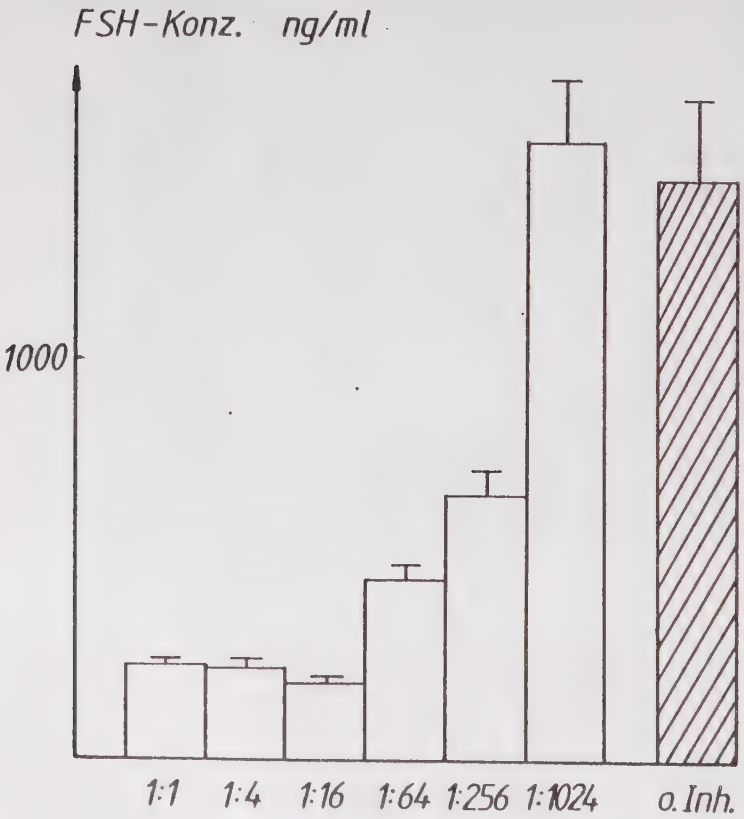

Abb.6: siehe Tabelle 8

Verdünnung der Inhibin-Testlsg.	$\bar{x}$ FSH-Konz. (ng/ml)	S.E.M.	% des Kontrollw. (o. Inhibin)
1:1	236	± 17	16,2
1:4	232	± 19	16,0
1:16	194	± 14	13,3
1:64	449	± 35	30,8
1:256	658	± 61	44,6
1:1024	1552	±156	106,8
Kontrollwert (o. Inhibin)	1454	±198	100

Tab.8: Abhängigkeit der FSH-Konzentration in Hypophysenzellkulturmedien von der Verdünnung der hinzugefügten Inhibin-Testlösung (Rinderfollikelflüssigkeit) ; Mittelwerte aus 6 Kulturen ; Versuchsansatz 1

Versuchsansatz 2

Verdünnung der Inhibin-Testlsg.	$\bar{x}$ FSH-Konz. (ng/ml)	S.E.M.	% des Kontrollw. (o. Inhibin)
1:1	144	± 21	34,4
1:4	112	± 38	26,4
1:16	108	± 13	25,5
1:64	nicht getestet		
1:256	158	± 27	37,6
1:1024	501	± 77	118,7
Kontrollwert	422	± 84	100

Tab.9: entsprechend der Tabelle 8 ; Versuchsansatz 2

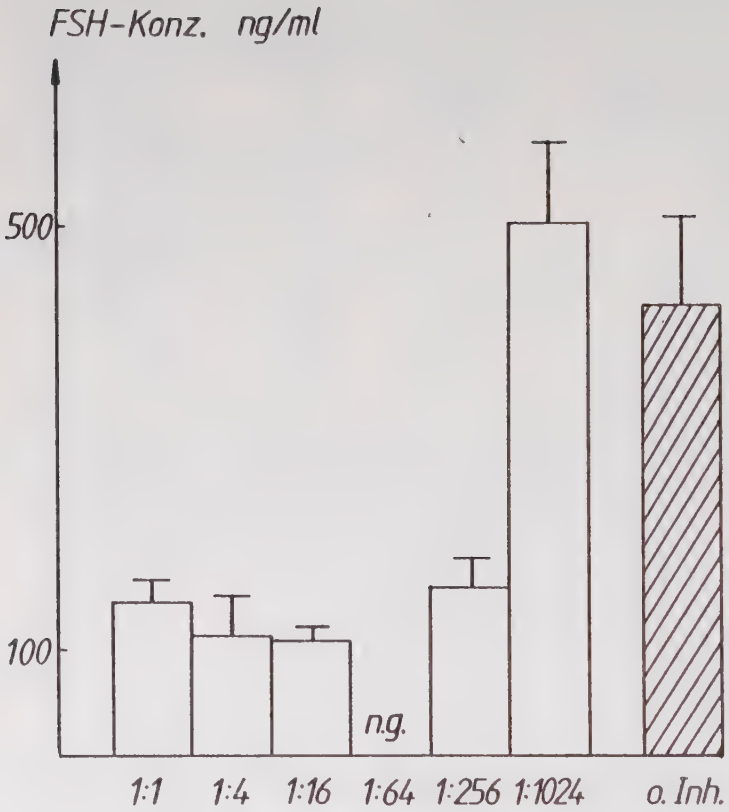

Abb.7: siehe Tabelle 9 (n.g. ≙ nicht getestet)

Die Ergebnisse des Versuchsansatzes 1 lassen eine deutliche Hemmung der FSH-Werte bei hohen Inhibin-Konzentrationen erkennen. Diese Hemmung ist bei den drei höchsten Inhibin-Konzentrationen (Verdünnung 1:1, 1:4 und 1:16) ungefähr identisch und fällt bei einer Verdünnung von 1:64 steil ab, um bei einer Verdünnung von 1:1024 die Kontrollwerte (ohne Inhibin) zu erreichen.
Die Ergebnisse des Versuchsansatzes 2 sind vergleichbar mit denen des Ansatzes 1.

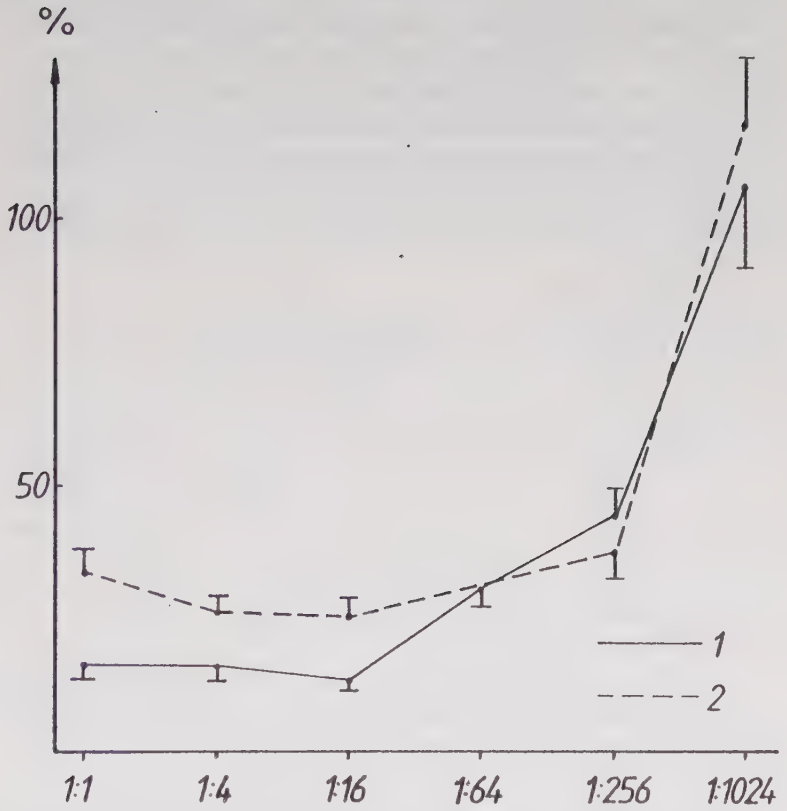

Abb.8: Prozentwerte (± S.E.M.) der FSH-Konzentrationen bei verschiedenen Verdünnungen der Inhibin-Testlösung in Bezug auf die jeweilige Kontrollgruppe (o. Inhibin); Ergebnisse aus zwei Versuchsansätzen

Die Abbldung 8 faßt die Ergebnisse der beiden Versuchsansätze zusammen (s.Tab. 8 und 9). Es werden die Prozentwerte der FSH-Konzentrationen in Bezug auf die jeweilige Kontrollgruppe ($FSH_{o.Inh.} \triangleq 100\%$) angegeben. Der hemmende Effekt des Inhibins auf die FSH-Konzentration ist hierbei deutlich sichtbar. Es wurde untersucht, ob diese beiden Kurven

statistisch identisch sind, was für eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sprechen würde. Die einzelnen Punkte der beiden Prozentkurven wurden mit dem Mann-und-Whitney-Test auf Gleichheit untersucht. Es zeigte sich, daß die Nullhypothese auf dem 1%-Niveau nicht zu verwerfen war. Dieses bedeutet bei 5 getesteten Punkten, daß die Kurven auf einem Gesammtsignifikanzniveau von 4,6% als identisch anzusehen sind.
Hiermit wurde eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nachgewiesen.

3.3.2. Inhibinassay mit Hypophysenhälftenkulturen

3.3.2.1. Erprobung des Assays mit unverdünnter Inhibin-Testlösung (Follikelflüssigkeit)

Es zeigte sich, daß Inhibin in der verwendeten Konzentration keinen Einfluß auf die FSH-Konzentration im Medium kultivierter Ratten-Hypophysenhälften hatte (s.Tab.10).

	FSH-Konz. 1. Hypophysenhälfte (mit Inhibin)	FSH-Konz. 2. Hypophysenhälfte (ohne Inhibin)
Hypophyse A	3065 ng/ml	3443 ng/ml
Hypophyse B	1821 "	2484 "
Hypophyse C	1968 "	3229 "
Hypophyse D	3709 "	3075 "
$\bar{x}$	2733 "	2996 "

Tab.10: Einfluß von Inhibin auf die FSH-Konzentration im Medium kultivierter Ratten-Hypophysenhälften

Die FSH-Konzentrationen in den Medien der Hypophysenhälftenkulturen, denen Inhibin beigegeben worden war, erwiesen sich als statistisch nicht unterscheidbar von denen ohne Inhibin. Der t-Test für verbundene Stichproben konnte bei Mittelwerten von 2733 ng/ml bzw. 2996 ng/ml, Standardabweichungen von $\pm$ 808 ng/ml bzw. $\pm$ 381 ng/ml und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% keine Unterscheidbarkeit der Werte finden.
Folglich scheint dieses Assay-System nicht in der Lage zu sein, Inhibin in der größten Konzentration der verwendeten Verdünnungsreihe nachzuweisen.

3.3.2.2. Ergebnisse der ergänzenden Versuche

Die Tabelle 11 gibt die Ergebnisse aus dem Versuch wieder, bei dem jeweils beide Hälften einer jeden Hypophyse getrennt unter gleichen Bedingungen kultiviert worden waren. Es werden die FSH-Konzentrationen im Medium der jeweiligen Hypophysenhälften-Kultur angegeben. Die Hälften der Hypophysen A-E hatten ausschließlich Kulturmedium erhalten, wogegen die Hypophysen F-K zusätzlich mit LHRH inkubiert worden waren.

	FSH-Konz. (ng/ml) 1. Hypophysenhälfte	FSH-Konz. (ng/ml) 2. Hypophysenhälfte
Hypophyse A	2313	1804
" B	1957	1289
" C	2250	3448
" D	2224	3041
" E	2023	2166
$\bar{x}$	2153	2349
s	± 154	± 886
Hypophyse F	3943	3851
" G	4753	3375
" H	2245	3916
" I	5507	4228
" K	4540	2469
$\bar{x}$	4197	3567
s	± 1226	± 685

Tab.11: FSH-Konzentration im Medium von Hypophysenhälften-Kulturen; jeweils beide Hälften einer Hypophyse unter gleichen Bedingungen kultiviert (A-E o.LHRH, F-K m.LHRH)

Bei manchen Hypophysen unterschied sich der FSH-Wert der einen Hälfte zwar stark von dem der anderen, im Kollektiv aller untersuchten Hypophysen läßt sich jedoch kein Unterschied diesbezüglich feststellen. Der t-Test für verbundene Stichproben konnte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sowohl in der Gruppe ohne LHRH wie in der mit LHRH keinen Unterschied in den Ergebnissen der jeweils zusammengehörigen Hypophysenhälften feststellen. Jedoch war die Streuung der Werte sehr groß..

Die Tabelle 12 gibt die Ergebnisse aus dem LHRH-Stimulationsversuch wieder. Es werden die FSH-Konzentrationen im Medium der Hypophysenhälften-Kulturen angegeben. Jeweils die eine Hälfte einer jeden Hypophyse hatte Medium mit LHRH erhalten, wogegen im Medium der zugehörigen Hälfte kein LHRH enthalten war.

	FSH-Konz. (ng/ml) 1. Hypophysenhälfte (mit LHRH)	FSH-Konz. (ng/ml) 2. Hypophysenhälfte (ohne LHRH)
Hypophyse A	5780	4504
" B	3402	5261
" C	6067	1359
" D	3806	2326
" E	3651	2162
$\bar{x}$	4541	3122
s	± 1274	± 1669

Tab.12: FSH-Konzentration im Medium von Hypophysenhälften-Kulturen; LHRH-Stimulationsversuch

Mit Ausnahme der Hypophyse B fanden sich bei allen übrigen Hypophysen deutlich höhere Werte bei den Hälften, die LHRH erhalten hatten, gegenüber der Kontrollhälfte. Die Hypo-

physe B zeigte das entgegengesetzte Verhalten. Der Mittelwert $\bar{x}$ in der Gruppe mit LHRH fand sich mit 4541 ng/ml deutlich erhöht gegenüber dem in der Kontrollgruppe mit 3122 ng/ml . Jedoch waren die Standardabweichungen s mit $\pm$ 1274 ng/ml bzw. $\pm$ 1669 ng/ml so hoch, daß sich die Unterschiede der Mittelwerte mit dem t-Test für verbundene Stichproben auf dem 5%-Niveau als nicht signifikant erwiesen.
Das bedeutet, daß sich ein stimulierender Effekt des LHRH auf die FSH-Konzentration im Medium von Hypophysenhälften-Kulturen nicht nachweisen ließ.

Die Tabelle 13 und die Abbildung 9 zeigen die Ergebnisse aus dem Versuch, bei dem die Abhängigkeit der FSH-Ausschüttung der Hypophysenhälften von der Inkubationsdauer untersucht wurde.

Inkubationsdauer (Std.)	mit LHRH (+) ohne LHRH (-)	$\bar{x}$ FSH-Konz. (ng/ml)	S.E.M. ($\pm$ ng/ml)
1	-	1101	331
1	+	1182	170
2	-	1956	594
2	+	2356	213
3	-	2476	367
3	+	3161	506
4	-	2758	596
4	+	4539	521

Tab.13: Abhängigkeit der FSH-Ausschüttung kultivierter Ratten-Hypophysenhälften von der Inkubationsdauer (Mittelwerte aus jeweils 3 Kulturen)

Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der FSH-Konzentration in den Kulturmedien mit der Inkubationsdauer. Der Anstieg war besonders deutlich bei den Kulturen, deren Medium LHRH beigefügt worden war. Ein stimulierender Effekt des LHRH

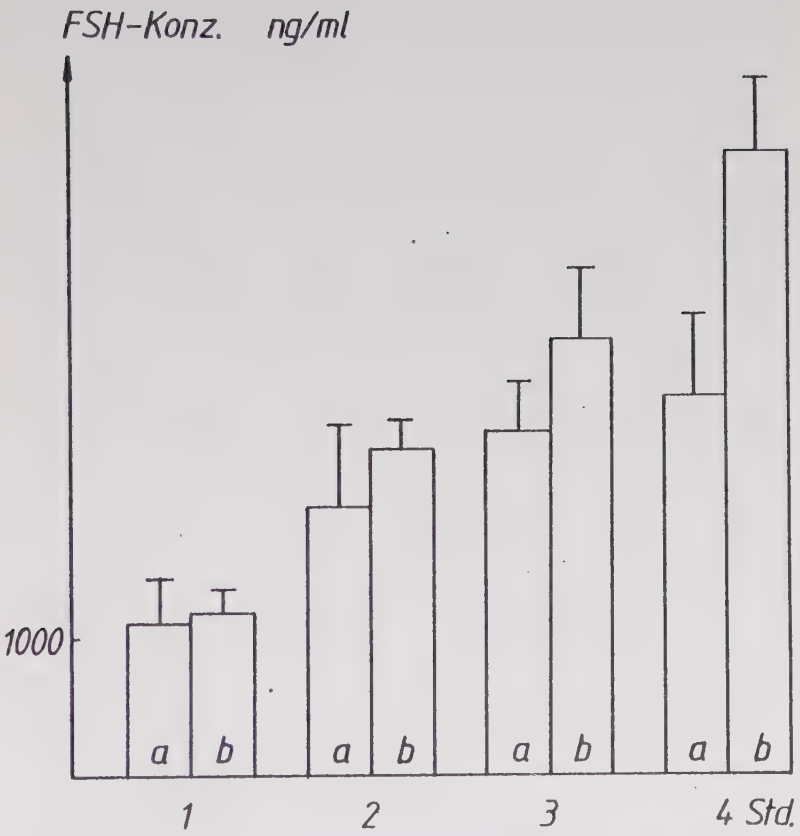

Abb.9: siehe Tabelle 13 (a ≙ ohne LHRH ; b ≙ mit LHRH)

auf die FSH-Ausschüttung war jedoch nur in der Gruppe mit 4-stündiger Inkubation nachweisbar. Nur hier fand sich eine signifikant höhere FSH-Konzentration in den Kulturmedien, denen LHRH beigefügt worden war, gegenüber denen ohne LHRH. Bei den Kulturen mit kürzerer Inkubationsdauer war kein signifikanter Unterschied der FSH-Werte in der Gruppe mit LHRH gegenüber der ohne LHRH nachweisbar.

3.4. DISKUSSION

Die Existenz vieler ungelöster Fragen in der Inhibinforschung führte zu einer großen Nachfrage nach spezifischen und praktikablen Inhibin-Assaymethoden zu deren Klärung. Zwar wurde eine ganze Reihe von Methoden beschrieben (s. Kap.2), viele davon sind jedoch mit erheblichen Nachteilen behaftet. Selbst die Bereitstellung eines spezifischen Inhibin-Radioimmunoassays (SHETH et al.,1978) konnte diese Probleme nicht restlos lösen. Durch diesen RIA läßt sich Inhibin zwar im Nanogrammbereich nachweisen (SHETH et al.,1979b), es wird jedoch nur ein umschriebener immunologischer Teilaspekt der Inhibinaktivität erfaßt, nämlich der, gegen den die Antikörper gerichtet sind. Inhibin liegt jedoch nicht als eindeutig definierbares Molekül vor, sondern weist eine ausgeprägte Heterogenität auf. So konnten beispielweise DAVIS et al. (1978) in Hammel-Rete-Testis-Flüssigkeit drei Inhibin-artige Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten isolieren. FRANCHIMONT et al. (1980) kamen bei Ziegen zu ähnlichen Ergebnissen. Der Nachteil eines Inhibin-Radioimmunoassays dürfte folglich in der mangelnden Erfassung des gesamten Spektrums inhibinaktiv-wirkender Substanzen liegen.Für bestimmte Fragestellungen ist es jedoch notwendig, Inhibin in seinem ganzen biologisch aktiven Spektrum nachzuweisen. Diese Anforderung kann bisher nur ein Bioassay erfüllen. Die existierenden Inhibin-Bioassaymethoden lassen sich in In-Vivo- und In-Vitro-Methoden einteilen (s. Kap.2). In-Vivo-Methoden haben den großen Nachteil, daß sie sehr unempfindlich sind und Inhibin nur in sehr großen Konzentrationen nachzuweisen vermögen (DE JONG et al.,1980 ; HUDSON et al.,1979 ; MOODBIDRI et al.,1980). Bei präparatorischen und physiologischen Untersuchungen ist jedoch der Nachweis von Inhibin auch in relativ kleinen Mengen erwünscht. Hier bietet sich das Inhibin-In-Vitro-Bioassay an. Die hierbei existierenden Methoden arbeiten alle nach verwandtem Prinzip. Zu Kulturen mit Hypophysengewebe bzw. isolierten Hypophysenzellen wird die zu messende Inhibin-Lösung hinzugefügt und die FSH-Konzentration im

Medium bestimmt. Die Erniedrigung der FSH-Konzentration ist hierbei der Indikator für die Inhibin-Aktivität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den zwei wesentlichen Vertretern dieser In-Vitro-Methoden gearbeitet: Assay mit Hypophysenhälftenkulturen - Assay mit Hypophysenzellkulturen.

Das Inhibin-Bioassay mit Hypophysenhälftenkulturen erwies sich als eine relativ einfach durchzuführende und zeitsparende Methode. Im Gegensatz zu den Berichten von DAVIS et al. (1978) war diese Methode jedoch nicht in der Lage, Inhibin nachzuweisen (Tab.10). Zwar zeigten sich in den Medien der Kulturen, zu denen Inhibin hinzugefügt worden war, etwas geringere FSH-Konzentration als in denen ohne Inhibin; diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. Dieses ist insofern erstaunlich, da als Inhibin-Testlösung eine relativ potente Quelle, nämlich Rinderfollikelflüssigkeit, Verwendung fand, in der SHETH et al. (1978) recht hohe Konzentrationen an Inhibin gefunden hatten. Die systematische Untersuchung dieser Assay-Methode zeigte erhebliche Schwachstellen auf. Der größte Nachteil liegt in dem sehr unterschiedlichen Verhalten der einzelnen Hypophysen. Zwar scheint eine Grundbedingung zum Funktionieren dieses Assays erfüllt zu sein, nämlich, daß jeweils die beiden Populationen aus korrespondierenden Hypophysenhälften unter identischen Bedingungen biologisch in gleicher Art und Weise reagieren (s. Tab.11), jedoch sind die Schwankungen der Ergebnisse von Hypophyse zu Hypophyse in unakzeptabler Weise groß. GUILLEMIN und VALE (1970) hatten gefunden, daß zwei Populationen aus korrespondierenden Hypophysenhälften unter identischen Bedingungen die gleiche Menge von ACTH und TSH ins Kulturmedium ausschütten und nahmen Entsprechendes auch für andere Hypophysenhormone an. Dieses konnte in Bezug auf das FSH bestätigt werden. Jedoch waren die Schwankungen in den Ergebnissen der einzelnen Hypophysen so groß, daß dieses der Grund für die statistische Nichtunterscheidbarkeit in der Reaktionsweise der beiden Hypophysenhälften-Populationen gewesen sein dürfte. Auf Grund dieser großen Streuung war

dieses System wohl auch nicht in der Lage, die Wirkung von Inhibin durch eine signifikante Änderung der FSH-Konzentration in den Kulturmedien anzuzeigen.
Entsprechendes gilt für die Wirkung von LHRH in einer Konzentration von 10nM auf die Hypophysenhälftenkulturen. Zwar zeigte sich, daß der Mittelwert der FSH-Konzentrationen bedeutend höher lag in den Kulturen, die LHRH erhalten hatten, gegenüber denen ohne LHRH (s. Tab.12), jedoch war dieser Effekt auf Grund der beachtlichen Schwankungen der Einzelwerte nicht signifikant. O'CONNER et al. (1979) hatten dagegen bei ähnlichem Versuchsaufbau signifikant höhere FSH-Werte bereits bei LHRH-Konzentrationen von 1nM erhalten.
Die Ergebnisse der Abhängigkeit der FSH-Ausschüttung von der Inkubationsdauer der Hypophysenhälften (s. Tab.13) entsprach in etwa denen von O'CONNER et al. (1979). Es zeigte sich eine massive initiale FSH-Ausschüttung in der Voinkubation ($\bar{x}$ = 2429 ng/ml), die wohl am ehesten durch die Verletzung des Hypophysengewebes erklärt werden kann. In der darauf folgenden 4-stündigen Inkubationsphase nahm die FSH-Konzentration in den Medien mit der Inkubationszeit dann langsamer zu. Ein signifikanter stimulierender Effekt des LHRH auf die FSH-Ausschüttung zeigte sich bei einer LHRH-Konzentration von 50nM erst nach 4 Stunden, wobei O'CONNER et al. (1979) einen solchen bereits nach 30 Minuten gefunden hatten. Zwar waren bereits nach 2-stündiger Inkubation deutlich höhere FSH-Werte bei den Kulturen erkennbar, die mit LHRH inkubiert worden waren, jedoch waren auch hierbei die Streuungen der Einzelwerte derart groß, daß der Unterschied nur in der Gruppe mit 4-stündiger Inkubation signifikant war.
Gesamtwertend läßt sich zu dieser Assay-Methode sagen, daß sie zwar recht einfach und schnell durchzuführen ist, jedoch auf Grund ihrer Unexaktheit in der Arbeitsweise und daraus resultierenden mangelnden Empfindlichkeit als Inhibin-Bioassay nicht zu empfehlen ist.

Anders zu beurteilen ist das Inhibin-Bioassay mit Hypophysen-

zellkulturen. Bei dieser Methode treten erhebliche methodische Schwierigkeiten in den Vordergrund. Immerhin ist es notwendig, Ratten-Hypophysenzellen aus ihrem Gewebsverband zu isolieren und für die Dauer von vier Tagen möglichst intakt am Leben zu erhalten. Die Hauptschwierigkeiten stellen hierbei also Probleme der Zellisolierung und Kultivierung dar.
Als empfehlenswerte Methode zur Zellisolierung erwies sich diejenige nach DENEF et al. (1976), die eine Variation derjenigen nach HOPKINS und FARQUHAR (1973) darstellt. Die von DENEF et al. (1976) betonten Vorteile ihrer Methode gegenüber der zweitgenannten konnten bestätigt werden. Sie liegen in einer signifikant höheren Zellausbeute (s. Tab.1) bei signifikant höherer Überlebensrate der Zellen (s. Tab.2). Allerdings konnte die beschriebene Überlebensrate von 95% mit durchschnittlich 72% nicht ganz erreicht werden.
Als besonders problematisch erwies es sich, die Zellkulturen frei von bakterieller und mykotischer Kontamination zu halten. Eine saubere Arbeitsweise mit sterilen Instrumenten, Cleanbench etc. war nicht ausreichend, da die Ratte als ein extrem kontaminiertes Versuchstier anzusehen ist. Nur die Verwendung von antibiotischen und antimykotischen Substanzen in den Kulturmedien konnte hier Abhilfe bringen. Dabei erwies sich jedoch die meist für Zellkulturen empfohlene Kombination von Penizillin G, Streptomycin und Amphotericin B (PERLMAN,1979) als insuffizient. Eine Ergänzung mit Chloramphenicol bzw. Polymyxin B erbracht bei zwar nachgewiesener Empfindlichkeit der Erreger keinen Vorteil, da die für Zellkulturen zulässige Dosis dieser Substanzen (PERLMAN, 1979) nicht ausreichend war, das Wachstum der Mikroorganismen zu verhindern. Erst die Kombination von Penizillin G, Streptomycin und Amphotericin B mit Doxycyclin bewahrte die Zellkulturen vor jeglicher mikrobiellen Kontamination.

Einen weiteren Vorteil bezüglich der Kulturbedingungen brachte die Beschichtung der Kulturgefäße mit Polylysin. Es zeigte sich der bereits bekannte Effekt, daß dadurch die Affinität der Zellen zur Gefäßoberfläche größer wird, als

diejenige zwischen den Zellen (MAZIA et al.,1975 ; MC KEEHAN and HAM,1976). Dieses verhindert Verklumpungen der Zellen (s. Abb.2 u. 3) und führt zu einem festen Kontakt der einzelnen Zellen mit der Gefäßoberfläche. Dieser Effekt dürfte insofern günstig sein, als einmal der Zellverlust beim Mediumwechsel gering ist, und andererseits die Stoffwechselbedingungen einer einzeln von Kulturmedium umspülten Zelle günstiger sein dürfte, als einer in einem Zellverband liegenden. Ein eventuell hemmender Effekt von im Medium gelösten Polylysin, der bezüglich des Zellwachstums beschrieben worden war (MC KEEHAN and HAM,1976), konnte bei Hypophysenzellen, die FSH-Ausschüttung betreffend, ausgeschlossen werden (s. Tab.3 und 4).
Unter den beschriebenen Kulturbedingungen gelang es, die Rattenhypophysenzell-Kulturen bei guter Vitalität über eine Dauer von vier Tagen zu kultivieren. Die FSH-Konzentration in den Medien zeigte den von DE JONG et al. (1979) beschriebenen Verlauf (s. Tab.5 und Abb.4). Am ersten Tag stieg die FSH-Konzentration rapide an, um sich dann vom 3. bis 5. Inkubationstag auf einen geringeren konstanten Zuwachs einzuspielen. Die Ursache dieses Verlaufs ist wohl darin zu sehen, daß am ersten Inkubationstag erhebliche Mengen FSH aus lädierten Hypophysenzellen ins Medium gelangen, und in den weiteren Inkubationstagen bei günstigen Kulturbedingungen nur noch ein geringer Teil der Zellen zu Grunde geht, sodaß dann der FSH-Zuwachs in der Basalausschüttung der überlebenden Zellen begründet sein dürfte. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Zellvitalfärbung unterstützt. Sie zeigte eine erhöhte Absterberate der Zellen nach der Zellisolierung und eine allmählige Abnahme dieser Rate bis zum 3. Inkubationstag auf dann gleichbleibende Werte. Aus dem oben Gesagten ergibt sich, daß der erste und zweite Inkubationstag für die Hypophysenzellen die kritische Phase darstellen, und es erscheint sinnvoll, die eigentliche Meßphase des Inhibin-Assays erst jenseits des dritten Tages durchzuführen, wie das von einigen Autoren empfohlen wurde (BAKER et al.,1978 ; DE JONG et al.,1979 ; EDDIE et al.,

1979 ; SCOTT et al.,1980). Die nach dem ersten Inkubationstag überlebenden Hypophysenzellen zeigten an den folgenden Tagen eine unverändert gute Vitalität, was sich außer in den Ergebnissen der Vitalfärbung (s.o.) darin zeigte, daß die Zugabe von LHRH während des 2. bis 5. Inkubationstages von den Hypophysenzellen mit in etwa gleicher FSH-Ausschüttung beantwortet wurde (s. Tab.6). Somit wurden wichtige Voraussetzungen für das Funktionieren dieser Methode als Inhibin-Bioassay nachgewiesen.
Die Zugabe von Inhibin-Testlösung zu den Hypophysenzellkulturen führte zu einer signifikanten dosisabhängigen Erniedrigung der FSH-Konzentration in den Kulturmedien. Die Ergebnisse der Tabelle 7 weisen in Übereinstimmung mit den Berichten von EDDIE et al. (1978) die Existenz von Inhibin im Medium von Rattenhodentubuli-Kulturen nach. In gleicher Weise zeigen die Ergebnisse der Tabellen 8 und 9 die Gegenwart von Inhibin in Rinderfollikelflüssigkeit, was zuerst von DE JONG und SHARPE (1976) nachgewiesen worden war. Die FSH-senkende Wirkung dieser Substanzen läßt sich nicht durch eventuelle Steroidhormon-Effekte erklären, da diese vor der Anwendung aus den Inhibin-Testlösungen weitgehend entfernt worden waren (s.3.2.1.). Erwartungsgemäß war der FSH-senkende Effekt bei Verwendung von Hodentubulikulturmedium als Inhibin-Testsubstanz geringer (s. Tab.7), als bei Verwendung von Follikelflüssigkeit (s. Tab.8 und 9), da das Verhältnis des Inhibin-Gehaltes in diesen Substanzen mit etwa 1:700 angegeben wird (DE JONG et al.,1979). Die FSH-senkende Wirkung, die unverdünntes Medium aus Hodentubulikulturen zeigte (s. Tab.7), wurde durch Follikelflüssigkeit in einer Verdünnung zwischen 1:256 und 1:1024 hervorgerufen (s.Tab.8). Das bedeutet, die Ergebnisse weisen auf ein Inhibin-Konzentrationsverhältnis in diesen Substanzen in von DE JONG et al. (1979) beschriebener Größenordnung hin.
Der Wiederholungsversuch mit Follikelflüssigkeit als Inhibin-Testlösung (s. Tab.9) ergab eine identische FSH-Hemmkurve (s. Abb.8). Dadurch wurde eine gute Reproduzierbarkeit

der Testergebnisse nachgewiesen.
Als qualitative Methode ist dieses Inhibin-Bioassay in der Lage, Inhibin sicher bis zu einer Konzentration nachzuweisen, die einer Follikelflüssigkeitsverdünnung von 1:256 entspricht. Da nach SHETH et al. (1978) Rinderfollikelflüssigkeit eine Inhibin-Konzentration von ca. 600 ng/ml besitzt, entspricht diese sichere untere Nachweisgrenze einer Inhibin-Konzentration von 2,3 ng/ml, bzw. bei der eingesetzten Menge von 100ul pro Kultur einer Inhibinmenge von 0,23 ng pro Kultur. Sie liegt damit bei weitem unter der Nachweisgrenze des Radioimmunoassays, die mit 10 ng pro Assayröhrchen angegeben wird (SHETH et al.,1978).
In einem anderen Bereich liegt die maximale Empfindlichkeit dieser Methode für die Verwendung als quantitatives Inhibin-Bioassay. Dieser Bereich liegt dort, wo die FSH-Hemmkurve die maximale Steigung hat, da in diesem Bereich kleine Inhibin-Konzentrationsänderungen große Änderungen der FSH-Konzentration in den Kulturmedien zur Folge haben. Wie aus der Abbildung 8 hervorgeht, liegt dieser Bereich bei Inhibin-Konzentrationen, die Follikelflüssigkeitsverdünnungen zwischen 1:256 und 1:1024 entsprechen, wobei weitergehende Untersuchungen die untere Nachweisgrenze bestimmen müßten. Nach SHETH et al. (1978) würde dieser Bereich einer Inhibin-Konzentration zwischen 2,3 ng/ml und 0,6 ng/ml entsprechen.

Das Inhibin-Bioassay mit Hypophysenzellkulturen stellt somit zwar eine in Aufwand und Dauer anspruchsvolle Methode dar, es ist jedoch in der Lage, Inhibin reproduzierbar in Mengen von unter einem Nannogramm nachzuweisen. Es hat somit eine größere Empfindlichkeit, als das Radioimmunoassay (SHETH et al.,1978) und alle übrigen Inhibin-Bioassaymethoden (MOODBIDRI et al.,1980).

4. ZUSAMMENFASSUNG

Tierexperimentelle und klinische Untersuchungen legen in zunehmenden Maße die Beteiligung des Hormons Inhibin bei der Regelung der Gonadotropine nahe. Zur Klärung offener Fragen wurde deshalb bald der Ruf nach geeigneten Inhibin-Meßmethoden laut. Mit diesem Problem, nämlich der Inhibin-Messung, beschäftigte sich die vorliegende Arbeit, wobei es ein Hauptanliegen war, eine praktikable und empfindliche Meßmethode bereitzustellen.

Es wurde ein Überblick über existierende Methoden gegeben, wobei die verschiedenen Formen des In-Vivo- und In-Vitro-Bioassays und das Radioimmunoassay in ihren Grundlagen erläutert und beurteilt wurden.

Durch eigene Untersuchungen wurden zwei Methoden, die geeignet erschienen, in ihrer Arbeitsweise analysiert und auf ihre Qualität überprüft. Die Methode, die sich hierbei als günstiger erwiesen hatte, wurde durch Einführung diverser Verbesserungen optimalisiert. Beide untersuchten Methoden arbeiten nach dem gleichen Prinzip, wobei die Wirkung des Inhibins ausgenutzt wird, die FSH-Ausschüttung in der Hypophyse zu hemmen. Die Erniedrigung der FSH-Konzentration im Medium von Kulturen mit Rattenhypophysengewebe bzw. -zellen nach Inhibinzugabe wird als Indikator der Inhibin-Aktivität betrachtet. Als Inhibin-Testsubstanz fanden bei den Untersuchungen einerseits Medium aus Rattenhodentubulikulturen, andererseits vorbehandelte Follikelflüssigkeit aus Rinderovarien Anwendung.

Das Bioassay mit Hypophysenhälftenkulturen erwies sich als eine wenig aufwendige und zeitsparende Methode. Systematische Untersuchungen bewiesen jedoch eine beachtliche Unexaktheit in der Arbeitsweise. Auf Grund der daraus resultierenden mangelnden Empfindlichkeit erwies sich diese Methode für die Verwendung als Inhibin-Assay als ungeeignet.

Im Gegensatz dazu fand sich das Bioassay mit Hypophysenzellkulturen mit erheblichen methodischen Schwierigkeiten verbunden. Diese sind vor allem in Problemen der Zellisolierung und -kultivierung zu sehen, die durch Einführung diverser

Verbesserungen gelöst werden konnten, wie zum Beispiel Wahl der geeigneten Zelltrennungsmethode - Wahl des geeigneten Kulturmediums - Überwindung hygienischer Probleme - Erleichterung der Zellkultivierung durch Polylysin-Beschichtung der Kulturgefäße - etc. . Systematische Untersuchungen wiesen einen positiven Effekt der eingeführten Änderungen nach und bewiesen eine gute Vitalität der Zellen nach viertägiger Kultivierung. Mit Hilfe dieser Methode ließ sich Inhibin sowohl in Rattenhodentubulikulturmedium, wie auch in Rinderfollikelflüssigkeit nachweisen, wobei reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Das Inhibin-Bioassay mit Hypophysenzellkulturen erwies sich als eine hochempfindliche Methode, die in der Lage ist, Inhibinmengen von unter 1 ng nachzuweisen. Es besitzt damit eine höhere Empfindlichkeit als alle übrigen Methoden, einschließlich dem Radioimmunoassay.

5. ANHANG

Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge

ACTH : Adrenocorticotropes Hormon

BSA : Rinderalbumin (bovine serum albumin)

c-AMP : Cyclisches Adenosinmonophosphat

cpm : Zählrate (counts per minute)

DMEM : Dulbecco Modified Eagles Medium

DNA : Desoxyribonucleinsäure

EDTA : Äthylendiamintetraacetat

FF : Follikelflüssigkeit

FSH : Follikel-Stimulierendes Hormon

HCG : Choriongonadotropin (human chorionic gonadotropine)

HEPES : N-2-Hydroxyäthylpiperazyl-N'-2-äthansulfonsäure

KRB : Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer

LH : Luteinisierendes Hormon

LHRH : LH-Releasing Hormon

NIAMDD : National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestiv Diseases; Bethesda, USA

PBS : Phosphat-gepufferte Salinelösung

RIA : Radioimmunoassay

s : Standardabweichung

S.E.M. : Mittlerer Fehler der Mittelwerte (standard error of mean)

STH : Somatotropes Hormon (Wachstumshormon)

TSH : Thyreoidea-Stimulierendes Hormon

$\bar{x}$: Mittelwert

6. LITERATURVERZEICHNIS

BAKER,H.W.G. ; BREMNER,W.J. ; BURGER,H.G. ; DE KRETSER,D.M.; DULMANIS,A. ; EDDIE,L.W. ; HUDSON,B. ; KEOGH,E.J.; LEE,V.W.K. ; RENNIE,G.C.: Testicular control of follicle-stimulating hormone secretion
Recent Prog. Horm. Res. 32, 429-476 (1976)

BAKER,H.W.G. ; BURGER,H.G. ; DE KRETSER,D.M. ; EDDIE,L.W. ; HIGGINSON,R.E. ; HUDSON,B. ; LEE,V.W.K.: Studies on purification of inhibin from ovine testicular secretions using an in vitro bioassay
Int. J. Androl. Suppl. 2, 115-124 (1978)

BANDIVDEKAR,A.H. ; VIJAYALAKSHMI,S. ; JASWANEY,V.L. ; SHETH,A.R.: Inhibin in human placenta
Indian J. Exp. Biol. 19, 744-745 (1981)

BLANC,M.R. ; CAHOREAU,C. ; COUROT,M. ; DACHEUX,J.L. ; HOCHEREAU-DE-REVIERS,M.T. ; PISSELET,C.: Plasma follicle-stimulating hormone suppression in the cryptorchid ram by a non-steroid factor (Inhibin) from ram rete testis fluid
Int. J. Androl. Suppl. 2, 139-146 (1978)

BLANC,M.R.: L'Inhibine
Reprod. Nutr. Dévelop. 20, 573-586 (1980)

CAHOREAU,C. ; BLANC,M.R. ; DACHEUX,J.L. ; PISSELET,C. ; COUROT,M.: Inhibin activity in ram rete testis fluid: depression of plasma FSH and LH in the castrate and cryptorchid ram
J. Reprod. Fert. Suppl. 26, 97-116 (1979)

CHANNING,C.P. ; GAGLIANO,P. ; HOOVER,D.J. ; TANABE,K. ; BATTA,S.K. ; SULEWSKI,J. ; LEBECH,P.: Relationship between human follicular fluid inhibin F activity and steroid content J. clin. Endocr. Metab. 52, 1193-1198 (1981)

CHARI,S. ; DURAISWAMI,S. ; FRANCHIMONT,P.: A convenient and rapid bioassay for inhibin Hormone Res. 7, 129-137 (1976)

CHARI,S. ; DURAISWAMI,S. ; FRANCHIMONT,P.: Isolation and characterization of inhibin from bull seminal plasma Acta endocr., Copenh. 87, 434-448 (1978)

CHARI,S. ; AUMÜLLER,G. ; DAUME,E. ; STURM,G. ; HOPKINSON,C.: The effekts of human follicular fluid inhibin on the morphology of the ovary of the immature rat Arch. Gynecol. 230, 239-249 (1981)

CHOWDHURY,M. ; STEINBERGER,A. ; STEINBERGER,E.: Inhibition of de novo synthesis of FSH by the sertoli cell factor Endocrinology 103, 644-647 (1978)

CROZE,F. ; GYSEN,P. ; DEMOULIN,A. ; FRANCHIMONT,P.: Effet de l'inhibine sur la synthèse de l'acide désoxyribonucléique du testicule du rat in vitro C. R. Soc. Biol. 174, 205-210 (1980)

DAVIS,R.V. ; MAIN,S.J. ; YOUNG,M.G.W.L. ; SETCHELL,B.P.: Bioassay of inhibin-like activity in rete testis fluid and its partial purification J. Endocr. 68, 26P (1976)

DAVIS,R.V. ; MAIN,S.J. ; SETCHELL,B.P.: Inhibin: Evidence for its existence, methods of bioassay and nature of the active material
Int. J. Androl. Suppl.2, 102-114 (1978)

DE JONG,F.H. ; SHARPE,R.M.: Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid
Nature, Lond. 263, 71-72 (1976)

DE JONG,F.H. ; SHARPE,R.M.: Gonadotrophins, testosterone and spermatogenesis in neonatally irradiated male rats: Evidence for a role of the sertoli cells in follicle-stimulating hormone feedback
J. Endocr. 75, 209-219 (1977)

DE JONG,F.H. ; WELSCHEN,R. ; HERMANS,W.P. ; SMITH,S.D. ; VAN DER MOLEN,H.J.: Effects of testicular and ovarian inhibin-like activity, using in vitro and in vivo systems
Int. J. Androl. Suppl. 2, 125-138 (1978)

DE JONG,F.H. ; SMITH,S.D. ; VAN DER MOLEN,H.J.: Bioassay of inhibin-like activity using pituitary cells in vitro
J. Endocr. 80, 91-102 (1979)

DE KRETSER,M. ; BURGER,H.G. ; HUDSON,B.: The relationship between germinal cells and serum FSH-levels in males with infertility
J. clin. Endocr. Metab. 38, 787-793 (1974)

DEL CASTILLO,E.B. ; TRABUCCO,A. ; DE LA BALZE,F.A.: Syndrome produced by absence of the germinal epithelium without impairment of the sertoli or leydig cells
J. clin. Endocr. Metab. 7, 493-502 (1947)

DEMOULIN,A. ; KOULISCHER,L. ; HUSTIN,J. ; HAZEE-HAGELSTEIN, M.T. ; LAMBOTTE,R. ; FRANCHIMONT,P.: Organ culture of mammalian testis - III. Inhibin secretion
Hormone Res. 10, 177-190 (1979)

DEMOULIN,A. ; VERSTRAELEN-PROYARD,J. ; BOURGIGNON,J.P. ; HUSTIN,J. ; KOULISCHER,L. ; BOLOGNE,R. ; FRANCHIMONT,P.: Origine et sites d'action de l'inhibine
Annls Endocr. 41, 291-302 (1980)

DENEF,C. ; HAUKEKEETE,E. ; RUBIN,E.: A specific population of gonadotrophs purified from immature female rat pituitary
Science 194, 848-851 (1976)

DE PAOLO,L.V. ; SHANDER,D. ; WISE,P.M. ; BARRACLOUGH,C.A. ; CHANNING,C.P.: Identification of inhibin-like activity in ovarian venous plasma of rats during the estrous cycle
Endocrinology 105, 647-654 (1979a)

DE PAOLO,L.V. ; WISE,P.M. ; ANDERSON,L.D. ; BARRACLOUGH,C.A.; CHANNING,C.P.: Suppression of the pituitary follicle-stimulating hormone secretion during proestrus and estrus in rats by porcine follicular fluid: Possible site of action
Endocrinology 104, 402-408 (1979b)

DULBECCO,R. ; FREEMAN,G.: Plaque production by the polyoma virus
Virologie 8, 396-397 (1959)

EDDIE,L.W. ; BAKER,H.W.G. ; DULMANIS,A. ; HIGGINSON,R.E. ; HUDSON,B.: Inhibin from cultures of rat seminiferous tubules
J. Endocr. 78, 217-224 (1978)

EDDIE,L.W. ; BAKER,H.W.G. ; HIGGINSON,R.E. ; HUDSON,B.:
A bioassay for inhibin using pituitary cell cultures
J. Endocr. 81, 49-60 (1979)

ERICKSON,G.F. ; HSUEH,A.J.W.: Secretion of "inhibin" by rat granulosa cells in vitro
Endocrinology 103, 1960-1963 (1978)

FRANCHIMONT,P.: Human gonadotrophin secretion
J. R. Coll. Physicians, Lond. 6, 283-298 (1972)

FRANCHIMONT,P. ; MILLET,D. ; VENDRELY,E. ; LETAWE,J. ; LEGROS,J. ; NETTER,A.: Relationship between spermatogenesis and serum gonadotrophin levels in azoospermia and oligospermia
J. clin. Endocr. Metab. 34, 1003-1008 (1972)

FRANCHIMONT,P. ; DEMOULIN,A. ; VERSTRAELEN-PROYARD,J. ; HAZEE-HAGELSTEIN,M.T. ; WALTONS,J.S. ; WAITES,G.M.M.: Nature and mechanisms of action of inhibin: Perspective in regulation of male fertility
Int. J. Androl. Suppl. 2, 69-80 (1978)

FRANCHIMONT,P. ; DEMOULIN,A. ; VERSTRAELEN-PROYARD,J. ; HAZEE-HAGELSTEIN,M.T. ; BOURGIGNON,J.P.:
Inhibine: Novelle hormone gonadique
Anns Endocr. 41, 3-19 (1980)

GUILLEMIN,R. ; VALE,W.: Bioassays of the hypophysiotropic hormons: in vitro systems
in: Hypophysiotropic hormones of the hypothalamus: Assay and chemistry; Meites,J. (Ed.), 1970
Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 21-35

GUPTA,D.: Gonadal steroids and gonadotrophin feedback regulation of mammalian sexual maturation
in: Recent progress in reproductive endocrinology
Crosignani,P.G. ; James,V.H.T. (Eds.)
Academic Press, London (1974)

GUPTA,D. ; RAGER,K. ; ZARZYCKI,J. ; EICHNER,M.: Levels of luteinizing hormone, follicle- stimulating hormone, testosterone and dihydrotestosterone in the circulation of sexually maturing intact male rats and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism
J. Endocr. 66, 183-193 (1975)

HAFEZ,E.S.E.: Male and female inhibin
Archs Androl. 5, 131-158 (1980)

HAM,R.G. ; MC KEEHAN,W.L.: Media and growth requirement
in: Methods of enzymology, Vol.53 Cell culture
Jakoby,B. ; Pastan,J.H. (Eds.) 44-93 (1979)

HELLER,C.G. ; NELSON,W.O.: The testis - pituitary relationship in man
Recent Prog. Horm. Res. 3, 229-255 (1948)

HENDERSON,K.M. ; FRANCHIMONT,P.: Regulation of inhibin production by bovine ovarian cells in vitro
J. Reprod. Fert. 63, 431-442 (1981)

HERMANS,W.P. ; VAN LEEUWEN,E.C.M. ; DEBETS,M.H.M. ; DE JONG,F.H.: Involvement of inhibin in the regulation of follicle-stimulating hormone concentrations in prepubertal and adult, male and female rats
J. Endocr. 86, 79-92 (1980)

HOCHBERG,Z. ; WEISS,J. ; RICHMAN,R.: Inhibin-like activity in extracts of rabbit placenta
Placenta 2, 259-264 (1981)

HOPKINS,C.R. ; FARQUHAR;M.G.: Hormone secretion by cells dissociated from rat anterior pituitaries
J. Cell Biol. 59, 276-303 (1973)

HOPKINSON,C.R.N. ; DAUME,E. ; STURM,G. ; FRITZE,E. ; KAISER,S. ; HIRSCHHAUER,C.: Inhibin-like activity of bovine ovarian extracts in male and female rats
J. Reprod. Fertil. 50, 93-96 (1977)

HUDSON,B. ; BAKER,H.W.G. ; EDDIE,L.W. ; HIGGINSON,R.E. ; BURGER,H.G. ; DE KRETSER,D.M. ; DOBOS,M. ; LEE,V.W.K.: Bioassay for inhibin: A critical review
J. Reprod. Fertil. Suppl. 26, 17-29 (1979)

HUNTER,W.M. ; GREENWOOD,F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity
Nature, Lond. 194, 495-496 (1962)

JOHNSON,M.H. ; THAKUR,A.N. ; SHETH,A.R.: Distribution of inhibin in testes of neonatal, pubertal, and adult rats
Archs Androl. 7, 127-131 (1981)

KEOGH,E.J. ; LEE,V.W.K. ; RENNIE,G.C. ; BURGER,H.G. ; HUDSON,B. ; DE KRETSER,D.M.: Selective suppression of FSH by testicular extracts
Endocrinology 98, 997-1004 (1976)

KLINEFELDER,H.F. ; REIFENSTEIN,E.C. ; ALBRIGHT,F.: Syndrome characterized by gynecomastia, aspermiogenesis without a-leydigism, and increased excretion of follicle-stimulating hormone
J. clin. Endocr. Metab. 2, 615-627 (1942)

KONINCKX,P.R. ; BROSENS,J.A. ; VERHOEVEN,G. ; DE MOOR,P.: Increased postovulatory plasma follicle-stimulating hormone levels in the luteinized unruptured follicle syndrome: A role for inhibin?
Br. J. Obstet. Gynaecol. 88, 525-529 (1981)

KREBS,H.A.: Body size and tissue respiration
Biochim. biophys. Acta 4, 249 (1950)

LABRIE,F. ; LAGACÉ,L. ; FERLAND,L. ; KELLY,P.A. ; DROUIN,J.; MASSICOTTE,J. ; BONNE,C. ; RAYNAUD,J.P. ; DORRINGTON,J.H.: Interaction between LHRH, sex steroids, and inhibin in the control of LH and FSH secretion
Int. J. Androl. Suppl. 2, 81-100 (1978)

LECOMTE-YERNA,M.J. ; HAZEE-HAGELSTEIN,M.T. ; CHARLET-RENARD,C.H. ; FRANCHIMONT,P.: Un méchanisme intracellulaire de l'action de l'inhibine sur la sécrétion de l'hormone folliculo-stimulante et de l'hormone lutéinisante induite par le LH-RH in vitro
C. R. Soc. Biol. 175, 385-388 (1981)

LEE,P.A. ; JAFFE,R.B. ; MIDGLEY,A.R. ; KOHEN,F. ; NISWENDER,G.D.: Regulation of human gonadotrophins. VIII. Suppression of serum LH and FSH in adult males following exogenous testosterone administration
J. clin. Endocr. Metab. 35, 636-641 (1972)

LEE,V.W.K. ; KEOGH,E.J. ; BURGER,H.G. ; HUDSON,B. ; DE KRETSER,D.M.: Studies on the relationship between FSH and germ cells: Evidence for selective suppression of FSH by testicular extracts
J. Reprod. Fertil. Suppl. 24, 1-15 (1976)

LEE,V.W.K. ; PEARCE,P.T. ; DE KRETSER,D.M.: The assassment of rodent models in evaluating the capacity of bovine testes extracts to suppress FSH-levels in: The testis in normal and infertile men
Troen,P. ; Nankin,H.R. (Eds.)
Raven Press, New York pp. 293-303 (1977)

LEE,V.W.K. ; MC MASTER,J. ; QUIGG,H. ; FINDLAY,J. ; LEVERSHA,L.: Ovarian and peripheral blood inhibin concentrations increase with gonadotrophin treatment in immature rats
Endocrinology 108, 2403-2405 (1981)

LEIBOVITZ,A.: The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere
Am. J. Hyg. 78, 173-180 (1963)

LEONARD,J.M. ; LEACH,R.B. ; CONTURE,M. ; PAULSEN,C.A.: Plasma and urinary follicle-stimulating hormone levels in oligospermia
J. clin. Endocr. Metab. 34, 209-214 (1972)

LORENZEN,J.R. ; CHANNING,C.P. ; SCHWARTZ,N.B.: Partial characterization of FSH-suppressing activity (folliculostatin) in porcine follicular fluid using the metestrous rat as an in vivo bioassay model
Biol. Reprod. 19, 635-640 (1978)

LOSTROH,A.J.: Hormonal control of spermatogenesis
in: Regulatory mechanisms of male reproductive physiology; Spilman,C.H. ; Lobl,T.J. ; Kirton,K.T. (Eds.)
Excerpta med. Elsevier, Amsterdam p.13 (1976)

LUGARO,G. ; CASSELLATO,M.M. ; MAZZOLA,G. ; FACHINI,G. ; CARREA,G.: Evidence for the existence in spermatozoa of a factor inhibiting the follicle-stimulating hormone releasing hormone synthesis
Neuroendocrinology 15, 62-68 (1974)

MACIEIRA-COELHO,A. ; AVRAMEAS,S.: Modulation of cell behavior in vitro by the substratum in fibroblastic and leukemic mouse cell lines
Proc. natn. Acad. Sci. USA 69, 2469-2473 (1972)

MANFORD,K. ; PATTERSON,Jr.: Measurement of growth and viability of cells in culture
in: Methods in enzymology, Vol.58 Cell culture
Jakoby,W.B. ; Pastan,J.H. (Eds.)
Academic Press, New York pp. 141-152 (1979)

MARTINS,T. ; ROCHA,A.: Regulation of the hypophysis by the testicle and some problems of sexual dynamics
Endocrinology 15, 421-434 (1931)

MAZIA,D. ; SCHATTEN,G. ; SALE,W.: Adhesion of cells to surfaces couted with polylysin
J. Cell Biol. 66, 198-200 (1975)

MC CULLAGH,D.R.: Dual endocrine activity of the testis
Science 76, 19-20 (1932)

MC KEEHAN,W.L. ; HAM,R.G.: Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers
J. Cell Biol. 71, 727-734 (1976)

MECKLENBURG,R.S. ; HETZEL,W.D. ; GULYAS,W.D. ; LIPSETT,M.B.: Regulation of FSH secretion; use of hydroxyurea of deplete germinal epithelium
Endocrinology 96, 564-570 (1975)

MOODBIDRI,S.B. ; VAZE,A.Y. ; SHETH,A.R.: Measurement of inhibin
Arch Androl. 5, 295-303 (1980)

MOODBIDRI,S.B. ; VIJAYALAKSHMI,S. ; BANDIVDEKAR,A.H. ; SHETH,A.R.: Inhibition of hypothalamic GnRH synthesis by inhibin
Experientia 37, 525-526 (1981)

MOTTRAM,J.C. ; CRAMER,W.: On the general effects of exposure to radium on metabolism and tumor growth in the rat and the special effects on testis and pituitary
Q. Jl exp. Physiol. 13, 209-222 (1923)

NANDINI,S.G. ; LIPNER,H. ; MONDGAL,N.R.: A model system for studying inhibin
Endocrinology 98, 1460-1465 (1976)

O'CONNER,J.L. ; ALLEN,M.B. ; MAHESH,V.B.: Evaluation of in vitro incubation systems for the study of gonadotropin release
Endocr. Res. Commun. 6, 15-36 (1979)

PERLMAN,D.: Use of antibiotics in cell culture media in: Methods in enzymology, Vol.57 Cell culture
Jakoby,W.B. ; Pastan,J.H. (Eds.)
Academic Press, New York pp. 110-116 (1979)

RAMASHARMA,K. ; SHASHIDHARA MURTHY,H.M. ; MOUDGAL,N.R.: A rapid bioassay for measuring inhibin activity Biol. Reprod. 20, 834-835 (1979)

ROSEN,S.W. ; WEINTRAUB,B.D.: Monotropic increase of serum FSH correlated with low sperm count in young men with ideopathic oligospermia and azoospermia J. clin. Endocr. Metab. 32, 410-416 (1971)

SAFFRAN,M. ; SCHALLY,A.V.: The release of corticotrophin by anterior pituitary tissue in vitro Can. J. Biochem. Physiol. 33, 408-415 (1955)

SCHALLY,A.V. ; ARIMURA,A. ; REDDING,T.W. ; DEBELJUK,L. ; CARTER,W. ; DUPONT,A. ; VILCHEZ-MARTINEZ,J.A.: Re-examination of porcine and bovine hypothalamic fractions for additional luteinizing hormone and follicle stimulating hormone-release activities Endocrinology 98, 380-391 (1976)

SCOTT,R.S. ; BURGER,H.G. ; QUIGG,H.: A simple and rapid in vitro bioassay for inhibin Endocrinology 107, 1536-1542 (1980)

SCOTT,R.S. ; BURGER,H.G.: Mechanism of action of inhibin Biol. Reprod. 24, 541-550 (1981a)

SCOTT,R.S. ; BURGER,H.G.: An inverse relationship exists between seminal plasma inhibin and serum follicle-stimulating hormone in man J. clin. Endocr. Metab. 52, 796-803 (1981b)

SHANDER,D. ; ANDERSON,L.D. ; BARRACLOUGH,C.A.: Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone affect the endogenous release of pituitary follicle-stimulating hormone and the ovarian secretion of inhibin in rats Endocrinology 106, 1047-1053 (1980)

SHERINS,R.J. ; LORIAUX,D.L.: Studies on the role of sex steroids in the feedback control of FSH concentration in men
J. clin. Endocr. Metabol. 36, 886-893 (1973)

SHETH,A.R. ; VAZE,A.Y. ; THAKUR,A.N.: Development of a radioimmunoassay for inhibin
Indian J. exp. Biol. 16, 1025-1026 (1978)

SHETH,A.R. ; JOSHI,L.R. ; MOODBIDRI,S.B. ; RAO,S.S.: Characterization of a gonadal factor involved in the control of FSH production
J. Reprod. Fertil. Suppl. 26, 71-75 (1979a)

SHETH,A.R. ; VAZE,A.Y. ; THAKUR,A.N.: Development of radioimmunoassay for human seminal plasma inhibin and its application for physiological studies
in: Recent advances in reproduction and regulation of fertility; Talwar,G.P. (Ed.)
Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam
pp. 233-240 (1979b)

SHETH,A.R. ; VANAGE,G.R. ; VAZE,A.Y. ; THAKUR,A.N.: Negative feedback of secretion of follicle-stimulating hormone by the pituitary gland of developing male rats
J. Endocr. 87, 401-407 (1980)

STEINBERGER,A. ; STEINBERGER,E.: Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured sertoli cells
Endocrinology 99, 918-921 (1976)

STEINBERGER,A.: Inhibin production by sertoli cells in culture
J. Reprod. Fertil. Suppl.26, 31-45 (1979)

STEWART-BENTLEY,M. ; ODELL,W. ; HORTON,R.: The feedback control of luteinizing hormone in normal adult men
J. clin. Endocr. Metab. 38, 545-553 (1974)

SWERDLOFF,R.S. ; WALSH,P.C.: Testosterone and oestradiol suppression of LH and FSH in adult male rats: Duration of castration, duration of treatment and combined treatment
Acta endocr., Copenh. 73, 11-21 (1973)

TENNANT,J.R.: Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability
Transplantation 2, 685 (1964)

THAKUR,A.N. ; VAZE,A.Y. ; DATTATREYAMURTY,B. ; ARBATTI,N.J.; SHETH,A.R.: Isolation and characterisation of inhibin from human seminal plasma
Indian J. exp. Biol. 16, 854-856 (1978)

THAKUR,A.N. ; VAZE,A.Y. ; DATTATREYAMURTY,B. ; SHETH,A.R.: Isolation and characterization of inhibin from human seminal plasma
Indian J. exp. Biol. 19, 307-313 (1981)

VANAGE,G.R. ; THAKUR,A.N. ; KADAM,M.S. ; SHETH,A.R.: Metabolic clearance rate of inhibin in mature and immature male rats
Biol. Reprod. 23, 606-610 (1980)

VANAGE,G.R. ; SHETH,A.R. ; KADAM,M.S.: In vivo effect of inhibin on FSH uptake by rat testis
Experientia 37, 433-434 (1981)

VAN THEIL,D.H. ; SHERINS,R.J. ; MYERS,G.H. ; DE VITA,V.T.: Evidence for a specific semniferous tubule factor influencing FSH secretion in man
J. clin. Invest. 51, 1009-1019 (1972)

VIJAYALAKSHMI,S. ; BANDIVDEKAR,A.H. ; JOSHI,L.R. ; MOODBIDRI,S.B. ; SHETH,A.R.: Isolation and characterization of ovine testicular and ovarian inhibin
Archs Androl. 5, 179-188 (1980a)

VIJAYALAKSHMI,S. ; MOODBIDRI,S.B. ; BANDIVDEKAR,A.H. ; SHETH,A.R.: Modulation of FSH by inhibin
Archs Androl. 5, 231-235 (1980b)

WELSCHEN,R. ; HERMANS,W.P. ; DULLAART,J. ; DE JONG,F.H.: Effects of an inhibin-like factor present in bovine and porcine follicular fluid on gonadotrophin levels in ovariectomized rats
J. Reprod. Fertil. 50, 129-131 (1977)

WISE,P.M. ; RANCE,N. ; BARR,G.D. ; BARRACLOUGH,C.A.: Futher evidence that luteinizing hormone-releasing hormone also is follicle-stimulating hormone-releasing hormone
Endocrinology 104, 940-945 (1979)

LEBENSLAUF

Am 1. Juni 1953 wurde ich, Christian Michaelsen, als Sohn des Ingenieurs Waldemar Michaelsen und seiner Ehefrau Ursula, geb. Weiß, in Eichstätt geboren.
Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Grundschule in Michelstadt und danach das Friedrich-Schiller Gymnasium in Ludwigsburg, an dem ich im Juni 1974 das Abitur ablegte.
Im Wintersemester 1974/75 nahm ich das Studium der Biologie an der Universität Tübingen auf und bestand 1976 das Vordiplom.
Mit dem Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1976/77 an der Universität Heidelberg. Nach Ablegung der Ärztlichen Vorprüfung im März 1978 wechselte ich an die Universität Tübingen. Im März 1979 bestand ich den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und im März 1981 den 2. Abschnitt. Das Praktische Jahr absolvierte ich am Kreiskrankenhaus Böblingen. Am 20. Oktober 1982 bestand ich den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Seit Januar 1983 bin ich am Zentralinstitut für Anaesthesiologie der Universität Tübingen als wissenschaftlicher Angestellter beschäftigt.